

# **Aptamer-basierte Therapieansätze im Kontext der hämatopoetischen Stammzelltransplantation**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)**

**der Fakultät für Biologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München**



Angefertigt am  
Institut für Molekulare Immunologie des Helmholtz Zentrum München  
Klinische Kooperationsgruppe Hämatopoetische Zelltransplantation  
unter der Leitung von Prof. Dr. Hans-Jochem Kolb  
und der Betreuung von Dr. Raymund Buhmann

vorgelegt von  
Marion Zerwes  
München, den 19. April 2012

Erstgutachter:	Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiss
Zweitgutachter:	Herr Prof. Dr. Josef Mautner
Mitgutachter:	Herr Prof. Dr. Michael Schleicher
	Herr Prof. Dr. Heinrich Jung

Dissertation eingereicht am:	19. April 2012
Tag der mündlichen Prüfung:	14. August 2012

*Meinem Papa*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1.1 Hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) .....	3
1.1.1 Prinzip und Ablauf der HSZT .....	3
1.1.2 Immunologischer Hintergrund .....	5
1.1.2.1 Humorale und zellvermittelte Immunantwort.....	6
1.1.2.2 CD40L als immunologisches Schlüsselmolekül .....	6
1.1.3 Problematik: GvHD und GvL-Effekt .....	8
1.2 Innovativer Therapieansatz: Die Redirektion von Effektorzellen.....	9
1.2.1 Prinzip des bispezifischen Ansatzes .....	9
1.2.2 Unterschiedliche Formate der bispezifischen Konstrukte .....	10
1.3 Nachteile bei der Verwendung von therapeutischen Antikörpern .....	12
1.3.1 Immunogenität .....	12
1.3.2 Zytokinfreisetzung .....	13
1.3.3 Pharmakokinetik.....	13
1.3.4 Produktion .....	13
1.4 Lösungsansatz: Übertragung des innovativen Therapieansatzes auf die Stoffklasse der Nukleinsäuren .....	14
1.4.1 Aptamere – Antikörper-ähnliche Moleküle .....	14
1.4.2 Identifizierung von Aptameren durch systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (SELEX).....	16
1.4.2.1 SELEX – eine Methode der kombinatorischen Chemie .....	16
1.4.2.2 Der SELEX-Prozess.....	17
1.4.3 Allgemeine Vorteile von Aptameren gegenüber Antikörpern .....	19
1.4.4 Aptamere in der Therapie .....	21
1.5 Zielsetzung der Dissertation.....	23
<b>2 Material.....</b>	<b>24</b>
2.1 Zellen .....	24
2.1.1 Blutproben.....	24
2.1.2 Zelllinien .....	24
2.2 Fluoreszenzmarkierte Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	25
2.3 Modifizierte Nukleotide.....	25
2.4 Oligonukleotide .....	26
2.4.1 Primer.....	26
2.4.2 Startbibliotheken .....	27
2.4.3 DNS-Aptamere und DNS-Matrizen für RNS-Aptamere.....	27
2.4.4 Modifizierte Aptamere .....	29
2.5 Längenstandards .....	29
2.6 Enzyme und Chemikalien .....	30
2.7 Kommerzielle Analysesysteme (Kits).....	32
2.8 Puffer und Lösungen.....	33

2.9	Verbrauchsmaterial .....	34
2.10	Technische Geräte / Laborausstattung .....	36
2.11	Computerprogramme .....	38
2.12	Personen .....	38
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>39</b>
3.1	Molekularbiologische Arbeiten .....	39
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	39
3.1.1.1	Präparative PCR .....	39
3.1.1.2	Markierungs-PCR („Tagging-PCR“) .....	40
3.1.2	In vitro Transkription .....	40
3.1.3	Gelelektrophorese .....	42
3.1.3.1	Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren .....	42
3.1.3.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Aufreinigung von RNS-Aptameren (PAGE) .....	43
3.1.4	Einzelstrang-Trennung doppelsträngiger DNS .....	44
3.1.5	Aufarbeitung und Aufreinigung von Nukleinsäuren .....	46
3.1.5.1	Silikat-Membran-basierte Aufreinigung von Nukleinsäuren .....	46
3.1.5.2	Phenol-Chloroform-Extraktion .....	47
3.1.5.3	Ethanol-Fällung von Nukleinsäuren .....	47
3.1.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	48
3.1.7	Radioaktive Markierung von Aptameren .....	49
3.1.7.1	Phosphorylierung von DNS-Aptameren .....	49
3.1.7.2	Herstellung radioaktiv markierter RNS-Aptamere .....	50
3.1.8	Filterbindungsanalyse (FBA) .....	50
3.1.9	Bestimmung der Affinität von Aptameren mittels Thermophorese .....	51
3.1.9.1	Prinzip der Thermophorese .....	52
3.1.9.2	Bestimmung der Affinität des DNS-Aptamers C10 an lösliches CD40-Ligand .....	54
3.1.10	Kopplung von Beads mit Proteinen .....	55
3.1.11	Tetramerisierung und Multimerisierung von biotinylierten Aptameren über Streptavidin .....	56
3.1.11.1	Tetramerisierung über lösliches Streptavidin .....	57
3.1.11.2	Multimerisierung über Dynabeads® M280-Streptavidin .....	57
3.2	Arbeiten mit humanen Zellen .....	59
3.2.1	Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) aus Vollblut .....	59
3.2.2	Magnet-assoziierte Zellseparation (MACS) .....	59
3.2.2.1	Isolation von B-, T- und CD4 <sup>+</sup> T-Zellen aus PBMC .....	60
3.2.2.2	Aptamer-basierte Zellseparation .....	61
3.2.3	Kultivierung von humanen Zellen .....	62
3.2.3.1	Kultivierung von Suspensionszelllinien .....	62
3.2.3.2	Kultivierung von PBMC, T- und B-Zellen aus frischem Blut .....	63
3.2.4	Bestimmung der Zellzahl pro ml (Neubauer-Zählkammer) .....	63
3.2.5	Stimulation von T-Zellen zur Aufregulation der CD40L-Expression .....	63
3.2.5.1	PMA / Ionomycin .....	64
3.2.5.2	Anti-CD3/CD28-Dynabeads® .....	64

3.2.5.3	T-Zell Aktivierungs-Platte .....	65
3.2.6	Stimulation von B-Zellen über CD40-CD40L-Interaktion .....	65
3.2.6.1	<i>MegaCD40L</i> <sup>TM</sup> .....	65
3.2.6.2	sCD40L und Verstärkermolekül („Enhancer“) Set.....	66
3.2.6.3	CD40L-positive T-Zellen .....	67
3.2.6.4	CD40L-gekoppelte Dynabeads® M450-Epoxy .....	67
3.2.6.5	Inhibitionskontrolle mit anti-CD40L-Antikörper 2B7 .....	68
3.2.7	Funktionale Analysen mit Aptameren .....	68
3.2.8	Aptamer-basierte Verbrückung von Zellen.....	68
3.2.9	Fluoreszenzmikroskopie von Zellen .....	69
3.3	Durchflusszytometrie.....	70
3.3.1	Prinzip der Durchflusszytometrie .....	70
3.3.2	Markierung von Oberflächenproteinen mit Antikörpern.....	71
3.3.3	Markierung von Oberflächenproteinen mit Aptameren .....	72
3.3.3.1	Cy5-markierte Aptamere .....	72
3.3.3.2	Biotinylierte Aptamere über Fluoreszenzfarbstoff-markiertes Streptavidin tetramerisiert .....	72
3.3.4	Durchflusszytometrie verbrückter Zellen.....	73
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>74</b>
4.1	Molekulare Charakterisierung vorhandener CD40L-spezifischer DNS- Aptamere.....	74
4.1.1	Bindung der DNS-Aptamere an verschiedene Formen von CD40L.....	74
4.1.2	Bindung der DNS-Aptamere in Anwesenheit von Medium mit Humanserum über die Zeit .....	78
4.1.3	Kompetition der DNS-Aptamerbindung durch CD40.....	81
4.1.4	Bestimmung der Dissoziationskonstante .....	84
4.1.4.1	Filterbindungsanalyse .....	84
4.1.4.2	Thermophorese .....	85
4.1.5	Kreuzreaktivität mit dem CD40-Ligand der Maus .....	87
4.1.6	Bindungsanalysen verkürzter Aptamere .....	88
4.2	Durchflusszytometrische Bindungsanalysen der DNS-Aptamere .....	90
4.2.1	Affinitäts- / Aviditätssteigerung durch Tetramerisierung über Biotin- Streptavidin .....	90
4.2.1.1	Einfluss durch freies Biotin im Medium .....	91
4.2.1.2	Unterschiede durch verschiedene Spacer-Längen und Spacer-Orientierung (5' vs. 3' Ende) zwischen Biotin und Aptamersequenz .....	93
4.2.2	Stabilität der DNS-Aptamerbindung über die Zeit .....	96
4.2.2.1	Einfluss des Humanserum-Anteils .....	96
4.2.2.2	Einfluss der Magnesiumchlorid-Konzentration.....	98
4.2.2.3	Stabilität der DNS-Aptamere in An- und Abwesenheit des Zielproteins .....	99
4.2.3	Bindung von tetramerisierten Aptameren an CD40L auf der Oberfläche stimulierter T-Zellen .....	102
4.2.3.1	Bindungssignal in Abhängigkeit der Stimulations-Art.....	102
4.2.3.2	Bindungssignal auf der T-Zelllinie Jurkat .....	106

4.3	Magnet-assoziierte Zellseparation CD40L-positiver T-Zellen auf DNS-Aptamer-Basis.....	108
4.4	Funktionale Analyse des inhibitorischen Potentials der DNS-Aptamere.....	111
4.4.1	Etablierung des zellulären Untersuchungssystems .....	111
4.4.2	Inhibition der B-Zell-Aktivierung durch CD40L-DNS-Aptamere .....	117
4.5	Verbrückung von T- und B-Zellen über multimerisierte DNS-Aptamere .....	119
4.5.1	Durchflusszytometrische Bindungsanalysen der DNS-Modellaptamere TD05 und Sgc8c .....	119
4.5.2	Fluoreszenzmikroskopie verbrückter Zellen.....	122
4.5.3	Durchflusszytometrische Analyse verbrückter Zellen .....	123
4.6	Molekulare Charakterisierung der 2'-Fluoro-RNS-Aptamere .....	125
4.6.1	Bindung der RNS-Aptamere an verschiedene Formen von CD40L.....	126
4.6.2	Bindung der RNS-Aptamere in Anwesenheit von Medium mit Humanserum über die Zeit .....	128
4.6.3	Kompetition der RNS-Aptamerbindung durch CD40.....	131
4.6.4	Bestimmung der Dissoziationskonstante .....	133
4.6.5	Kreuzreaktivität mit dem CD40-Ligand der Maus .....	135
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>136</b>
5.1	Molekulare Charakterisierung vorhandener CD40L-spezifischer DNS-Aptamere.....	137
5.2	Durchflusszytometrische Bindungsdaten der DNS-Aptamere.....	141
5.3	Aptamer-basierte Zellseparation .....	144
5.4	Funktionale Analyse der DNS-Aptamere .....	145
5.5	Verbrückung zweier Zellpopulationen über multivalente bispezifische Aptamere.....	148
5.6	RNS-Aptamere .....	150
5.7	Ausblick .....	153
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>156</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>166</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	166
7.2	Tabellenverzeichnis .....	169
7.3	Abkürzungsverzeichnis .....	169
	<b>Erklärung .....</b>	<b>173</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>174</b>

## Zusammenfassung

Komplikationen nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT), allen voran die Transplantat-Wirt-Reaktion („Graft-versus-Host Disease“, GvHD), sind daran Schuld, dass die Gesamt-Überlebensraten immer noch bei lediglich 40 - 60 % liegen. Die derzeitig gängige Therapie einer GvHD ist immunsuppressiv, wodurch die GvHD zwar reduziert werden kann, der positive anti-leukämische Effekt („Graft-versus-Leukemia“, GvL) aber gleichzeitig abgeschwächt wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das therapeutische Potential von Aptameren für neuartige Therapieansätze untersucht werden, die eine GvHD-Reaktion effektiv verringern können, ohne dabei den wichtigen GvL-Effekt zu verhindern.

Ein möglicher Lösungsansatz dafür besteht in der Entwicklung einer Immunsuppression, die spezifischer gegen GvHD-reaktive Zellen wirkt. Hierfür wurden CD40L-spezifische Aptamere analysiert. Die Interaktion des immunologischen Schlüsselmoleküls CD40L, das nach Antigenkontakt von T-Zellen exprimiert wird, mit CD40 auf antigenpräsentierenden Zellen spielt auch in der Entstehung der GvHD eine entscheidende Rolle. Durch eine selektive Blockade dieser Interaktion könnten GvHD-reaktive T-Zellen unterdrückt werden. Im ersten Schritt wurden zehn CD40L-spezifische DNS-Aptamerklone auf molekularer Ebene charakterisiert. Alle Aptamere zeigten eine sehr hohe Spezifität für das Zielprotein der Selektion und keine Kreuzreaktivität mit CD40L der Maus. Sehr schnell kristallisierte sich der Klon S51A-C10 als besonders interessant heraus. Als einziges Aptamer zeigte es eine vergleichbare Bindung an ein weiteres kommerziell erhältliches CD40L-Produkt. Die Bindung des Aptamers war auch in RPMI-Medium mit 1 % Humanserum über 24 h stabil und die errechnete  $K_d$  lag im nanomolaren Bereich. Kompetitionsanalysen mit CD40 ergaben, dass der Bindungsbereich der DNS-Aptamere mit dem CD40-Interaktionsbereich übereinstimmt oder zumindest teilweise überlappt. Eine Verkürzung des Aptamers S51A-C10 um 28 Basen auf eine Länge von nunmehr 52 Basen war ohne Bindungseinbruch möglich. Die interessanten Aptamere S51A-C10 sowie die verkürzte Variante C10-28 zeigten in durchflusszytometrischen Analysen ebenfalls eine stabile Bindung über 18 h in RPMI mit 1 % Humanserum. Eine Tetramerisierung steigerte die Affinität über den Aviditätseffekt. Dabei fiel auf, dass die Länge der Abstandhaltermoleküle mit der Aptamerlänge korrelieren muss, um dem Aptamer genug Freiheitsgrade zur optimalen Faltung zu gewähren. Das zelluläre CD40L auf der Oberfläche von T-Zellen wurde von den Aptameren ebenfalls gebunden, wodurch auch



eine Aptamer-basierte MACS-Separation von CD40L-positiven Zellen möglich war. Für die funktionale Analyse der Aptamere wurde ein zelluläres Untersuchungssystem etabliert, in dem B-Zellen über 18 h durch lösliches CD40L stimuliert werden, was zu einer Aufregulation des kostimulatorischen Moleküls CD86 führt. Durch die Zugabe von tetramerisierten Aptameren konnte die aktivierungsinduzierte Aufregulation von CD86 partiell inhibiert werden. Diese Daten liefern einen klaren Hinweis auf das inhibitorische Potential der Aptamere, was sie für einen therapeutischen Einsatz interessant macht.

Ein weiterer vielversprechender Therapieansatz ist die Redirektion von Effektorzellen, weg von GvHD-sensitiven Geweben hin zu leukämischen Zellen. Die Übertragung dieses innovativen Konzeptes auf die Stoffklasse der Aptamere sollte im Rahmen dieser Arbeit konzeptionell angelegt werden. Dafür wurden mit den bekannten DNS-Modellaptameren TD05 (B-Zellbinder, Ramos) und Sgc8c (T-Zellbinder, T-Zell ALL Zelllinien, wie Jurkat) Machbarkeitsuntersuchungen durchgeführt. Fluoreszenzmikroskopisch konnte die Verbrückung der zwei verschiedenen Zelltypen über multivalente bispezifische Aptamere gezeigt werden. Durchflusszytometrische Daten legen außerdem eine, durch diese Verbrückung zustande kommende, zytolytische Aktivität nahe. Auch diese Daten belegen das hohe Potential von Aptameren für den therapeutischen Einsatz.

Auch CD40L-spezifische 2'-Fluoro-RNS-Aptamere wurden in Analogie zu den DNS-Aptameren auf molekularer Ebene charakterisiert. Die RNS-Aptamere zeigten dabei ebenfalls eine hohe Spezifität für das Zielprotein der Selektion. Trotz dem Einbau von 2'-Fluoro-Pyrimidinen brach die Bindung der RNS-Aptamere in RPMI mit 1 % Humanserum innerhalb von wenigen Minuten ein. Die Affinität der RNS-Aptamere war um zwei Log-Stufen schlechter, als die der DNS-Aptamere. Einzig die deutliche Kreuzreaktivität mit dem löslichen CD40L der Maus war vor dem Hintergrund einer erleichterten präklinischen Validierung eine interessante Beobachtung.

# 1 Einleitung

## 1.1 Hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT)

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) ist die wichtigste kurative Behandlungsmethode von lebensbedrohlichen Erkrankungen des blutbildenden Systems wie Leukämien, Lymphomen und auch Störungen des Immunsystems, zum Beispiel aplastische Anämien und Erbkrankheiten. Allein in Europa werden jährlich über 12.000 HSZT durchgeführt.

### 1.1.1 Prinzip und Ablauf der HSZT

Bei der HSZT werden Blutstammzellen von einem Spender auf einen Empfänger übertragen und sollen im Empfänger dauerhaft die Blutbildung übernehmen. Die wichtigste Voraussetzung für eine erfolgreiche allogene Transplantation ist ein kompatibler Spender. Dazu wird die Kompatibilität der Gewebemerkmale nach dem HLA-System (humanes Leukozytenantigen-System) untersucht. Das HLA-System beschreibt hochpolymorphe Moleküle der Zellmembran, die Peptide binden und den T-Zellen präsentieren. Sie kennzeichnen die Zelle als „zum Körper gehörend“. Die HLA-Moleküle werden durch eine Vielzahl von Genen kodiert, die sich im Bereich der MHC-Region (engl.: „Major Histocompatibility Complex“) auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 befinden. Die verschiedenen Gene der MHC-Region lassen sich in zwei Klassen einteilen; Klasse I bilden die Loci HLA-A, -B, -C und Klasse II die Loci HLA-DP, -DQ, -DR. Durch ihre Vielfalt sind millionenfache Kombinationen möglich, was die Suche nach einem passenden Spender durchaus schwierig gestalten kann, vor allem wenn kein naher Verwandter als Spender zur Verfügung steht. Um eine HSZT durchzuführen, müssen mindestens sechs der HLA-Loci übereinstimmen. Je mehr HLA-Merkmale von Spender und Empfänger sich gleichen, desto größer ist die Chance für eine erfolgreiche Transplantation, während für jedes „HLA-Mismatch“ (= HLA-Fehlpaarung) die Wahrscheinlichkeit der Abstoßung des Transplantats und das Risiko für den Empfänger steigt. Die größte Gefahr besteht in der Entwicklung einer Transplantat-Wirt-Reaktion („Graft-versus-Host Disease“, GvHD), bei der die Immunzellen des Spenders das Empfängergewebe als fremd erkennen und angreifen.

Die Gewinnung von hämatopoetischen Stammzellen kann auf verschiedene Wege erfolgen:

- **Klassische Knochenmarkspende:** Dem Spender wird in der Regel aus dem Beckenkamm durch Aspiration etwa ein Liter Knochenmark-Blut-Gemisch entnommen und dem Empfänger transfundiert.
- **Periphere Blutstammzellspende:** Der Spender bekommt etwa eine Woche lang das Wachstumshormon G-CSF (Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor) gespritzt, welches bewirkt, dass Stammzellen aus dem Knochenmark ins Blut wandern, woraus sie mittels Stammzellapharese gefiltert und anschließend dem Empfänger transfundiert werden.
- **Nabelschnurblutspende:** Direkt nach der Geburt wird aus der Nabelschnurvene das enthaltene Blut abgesaugt, die Stammzellen daraus extrahiert und gespendet oder zum späteren eigenen Gebrauch kryokonserviert.

Um die Spender-Stammzellen dem Empfänger übertragen zu können, muss dieser zuerst durch eine geeignete Konditionierung vorbereitet werden. Diese besteht aus Immunsuppression, Chemotherapie und/oder Ganzkörperbestrahlung und dient zum einen der Eradikation des erkrankten Knochenmarks sowie der Unterdrückung einer Immunreaktion gegen das Transplantat („myeloablative“, das heißt knochenmark-zerstörende oder nicht-myeloablative Konditionierung). Je intensiver die Konditionierung vor der eigentlichen Transplantation ist, desto schwerwiegender sind zwar die Nebenwirkungen, aber desto geringer sind die Risiken für einen Rückfall nach der Transplantation sowie für ein Nichtanwachsen oder eine Abstoßung des Transplantats.

Die Transplantation selbst erfolgt durch eine einfache Transfusion des Transplantats über einen Venenkatheter. Vom Blutkreislauf finden die gespendeten Stammzellen selbst den Weg in den Knochen, wo sie nach etwa zehn Tagen mit der Produktion neuer Blutzellen beginnen. Leukämische oder andere bösartige Zellen des Empfängers, die die Konditionierung überlebt haben, werden meist von Spenderzellen mit der so genannten „Transplantat gegen Leukämie-Reaktion“ („Graft-versus-Leukemia“, GvL) zerstört.

Nach der Transplantation erhält der Empfänger noch für etwa 60 Tage eine immunsuppressive Therapie, um das Anwachsen des Transplantats zu erleichtern und

überschießende Immunreaktionen zu unterdrücken. Anschließend wird versucht, die immunsuppressiven Medikamente auszuschleichen. Bis die transplantierten Stammzellen ein vollständiges neues Immunsystem ausbilden und solange die immunsuppressive Behandlung anhält, ist der Patient nach der Transplantation einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt.

Das Besondere an einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation im Vergleich zu einer Organtransplantation liegt darin, dass die Immunsuppression etwa 60 Tage nach HSZT ausgeschlichen werden kann und das Immunsystem nach einigen Jahren wieder dem eines gesunden Menschen entspricht.

### 1.1.2 Immunologischer Hintergrund

Das menschliche Immunsystem ist ein hochkomplexes Zusammenspiel verschiedener Organe, Gewebe, Zellen und Moleküle, dessen wichtigste Funktion darin besteht, zwischen körpereigenen und -fremden oder schädlichen Bestandteilen zu unterscheiden (Matzinger, 2002). So schützt es den Körper vor Krankheitserregern (z. B. Viren und Bakterien), aber auch vor krankhaft veränderten (z. B. entarteten) Zellen, während es sicher stellt, dass es zu keiner Immunreaktion gegen körpereigene Komponenten kommt.

Eine schnelle, erste Verteidigungslinie des Immunsystems gegen Pathogene stellt die **angeborene Immunität** dar. Sie besteht aus Granulozyten, Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen (engl.: „dendritic cell“, DC) sowie natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und entwickelt ihre Wirkung unmittelbar und erregerübergreifend, nachdem der Erreger durch die Oberflächenepithelien des Körpers gedrungen ist.

Scheitert die angeborene Immunität, setzt etwa vier bis sechs Tage nach einer Infektion die **adaptive Immunität** ein. Sie ist erregerspezifisch und setzt sich vor allem aus T- und B-Lymphozyten zusammen, die in peripheren lymphatischen Geweben (z. B. Lymphknoten und Milz) von dendritischen Zellen und Makrophagen aktiviert wurden und die humorale und zellvermittelte Immunantwort anstoßen. Durch diese gezielte Immunreaktion der adaptiven Immunität gegen ein bestimmtes Antigen entsteht ein spezifisches und langlebiges immunologisches Gedächtnis, welches bei erneuter Infektion mit demselben Pathogen zu einer schnellen und effizienten Immunantwort in der Lage ist.

### 1.1.2.1 Humorale und zellvermittelte Immunantwort

Naive T- und B-Lymphozyten zirkulieren solange zwischen Blut- und Lymphsystem, bis sie ihr spezielles Antigen erkennen, das von einer antigenpräsentierenden Zelle (engl.: „antigen-presenting cell“, APC) aufgenommen wurde und in Form von Peptiden auf MHC-Molekülen präsentiert wird.

Die **humorale Immunantwort** wird hauptsächlich von B-Zellen übernommen, die lösliche Immunglobuline (Ig) produzieren, welche direkt an Pathogene binden können. T-Zellen hingegen erkennen Antigene auf MHC-Molekülen der Körperzellen und können infizierte oder entartete Zellen direkt eliminieren, auch als **zellvermittelte Immunantwort** bezeichnet.

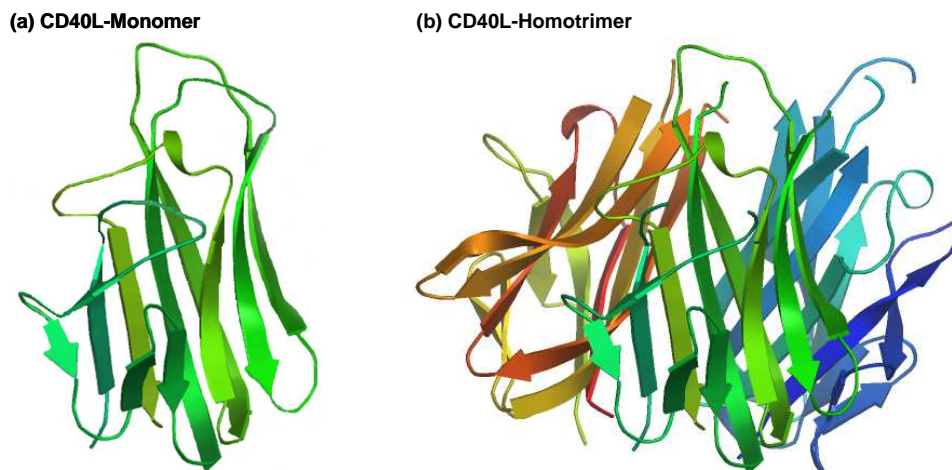
In beiden Fällen reicht die bloße Erkennung des Antigens aber nicht für eine erfolgreiche Aktivierung und Entwicklung zu Effektorzellen aus. Dafür werden zusätzlich sogenannte kostimulatorische Signale benötigt. Fehlt das kostimulatorische Signal, führt das zur immunologischen Anergie, das heißt, eine erneute Stimulation dieser Zelle ist nicht möglich. Oder es wird sogar ein intrazellulärer Signaltransduktionsweg angeschaltet, der zum programmierten Zelltod führt (Liu & Linsley, 1992; Noel et al., 1996). Somit wird verhindert, dass autoreaktive T-Zellen allein über das Antigen, das ihr T-Zell-Rezeptor erkennt, aktiviert werden können, oder dass es zu einer Produktion von Autoantikörpern in großen Mengen allein über einen Antigenkontakt mit dem B-Zell-Rezeptor kommt.

### 1.1.2.2 CD40L als immunologisches Schlüsselmolekül

Neben dem kostimulatorischen Signal über CD28 (auf T-Zellen) und B7-1 (CD80) oder B7-2 (CD86) auf antigenpräsentierenden Zellen ist die Interaktion von CD40 und CD40L sowohl für die humorale als auch zellvermittelte Immunantwort entscheidend (Durie et al., 1994b; Foy et al., 1996; June et al., 1994; Noelle, 1996).

CD40 ist ein 50 kDa Glykoprotein der TNF-Rezeptor Familie (TNF = Tumor Nekrose Faktor) und wird von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert, einschließlich B-Zellen (Clark & Ledbetter, 1986; Stamenkovic et al., 1989). Aktivierte T-Zellen, vor allem CD4<sup>+</sup> T-Zellen, tragen nach Antigenkontakt das mit CD40 interagierende Typ II Transmembranprotein CD40-Ligand (CD40L oder auch CD154), ein Mitglied der TNF-

Superfamilie (Hollenbaugh et al., 1992). CD40L bildet auf der Oberfläche von T-Zellen ein Homotrimer, dessen 39 kDa Monomere hauptsächlich aus  $\beta$ -Faltblättern bestehen (siehe Abbildung 1.1). Mittlerweile ist bekannt, dass CD40L auch von einer Reihe weiterer Zellen exprimiert wird, darunter dendritische Zellen, Makrophagen, Thrombozyten, Mastzellen, Endothelzellen, Epithelzellen und einige mehr (Schönbeck & Libby, 2001). Auch eine lösliche Form von CD40L (sCD40L), die von T-Zellen produziert wird, konnte nachgewiesen werden (Graf et al., 1995).



**Abb. 1.1: Struktur des löslichen CD40-Ligand-Monomers (a) und des Homotrimers (b).** (Adaptiert von der „Protein Data Bank Europe“: <http://www.ebi.ac.uk/pdbe/>)

Wie wichtig die Rolle der CD40-CD40L-Interaktion ist, belegen in vivo Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern sowie die Effekte von genetischen Mutationen in CD40L oder CD40. Diese zeigen, dass B-Zell-Proliferation, Ig-Sekretion und -Klassenwechsel (class switch) sowie auch die Aufrechterhaltung von Keimzentren und Gedächtnis-B-Zellen von dieser Interaktion abhängen (Allen et al., 1993; Foy et al., 1993; Gray et al., 1994; Kawabe et al., 1994). Sowohl Mutationen im CD40L- als auch im CD40-Gen können zum Hyper-IgM-Syndrom führen (Typ I bzw. III), da das Signal zum Ig-Klassenwechsel entweder von der T- nicht auf die B-Zelle übertragen, oder von der B-Zelle nicht empfangen werden kann.

Die Interaktion von CD40 und CD40L spielt auch in der Entstehung von akuter und chronischer GvHD eine entscheidende Rolle (Durie et al., 1994a). Im Maus-Modell wurde gezeigt, dass ein monoklonaler anti-CD40L-Antikörper die Entwicklung einer GvHD blockieren sowie eine  $CD4^+$  T-Zell vermittelte Transplantat-Abstoßung verhindern kann (Blazar et al., 1998; Blazar et al., 1997; Foy et al., 1996).

### **1.1.3 Problematik: GvHD und GvL-Effekt**

Obwohl die Transplantationsverfahren, und damit auch die Heilungsraten, in den letzten Jahren verbessert werden konnten, liegen die Gesamt-Überlebensraten bei lediglich 40 - 60 %. Die im Transplantat enthaltenen T-Zellen können für die Entstehung einer gefährlichen GvHD verantwortlich sein. Dabei handelt es sich um eine lebensbedrohliche Komplikation nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation, bei der T-Lymphozyten des Spenders Empfängerewebe als fremd erkennen und angreifen. Von dieser Reaktion sind vorwiegend Haut, Leber und Magen-Darm-Trakt betroffen. Eine GvHD kann bereits innerhalb weniger Wochen (akute GvHD), oder auch erst sehr viel später nach Transplantation (chronische GvHD) auftreten. Durch die Behandlung mit Immunsuppressiva kann eine GvHD zwar reduziert werden, allerdings steigt dadurch die Anfälligkeit des Patienten für lebensbedrohliche Infektionen. Und obwohl es sich bei der GvHD um eine schwerwiegende Komplikation handelt, ist eine abgeschwächte Reaktion meist von einem anti-leukämischen Effekt begleitet (GvL-Effekt). Hierbei bekämpfen und zerstören die Spenderzellen (T- und NK-Zellen) verbleibende leukämische Zellen und tragen so dazu bei, die Rezidivrate zu verringern und die Erkrankung zu heilen.

Fortschrittliche Behandlungsformen sind daher unbedingt notwendig, um die Herausforderung allogener Stammzelltransplantationen zur Behandlung von Leukämien und anderen malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems zu überwinden. Dabei reicht es nicht aus, die Spender-T-Zellen generell zu supprimieren und so die Häufigkeit und den Schweregrad einer GvHD zu verringern, da dadurch gleichzeitig das Risiko eines Rezidivs und auch die Anfälligkeit für Infektionen steigen. Simultan muss auch die optimale Ausbildung eines GvL-Effektes ermöglicht werden (Butcher & Collins, 2005; Ritgen et al., 2004).

## **1.2 Innovativer Therapieansatz: Die Redirektion von Effektorzellen**

Neue Chemotherapieansätze, der Einsatz monoklonaler Antikörper, wie Alemtuzumab (anti-CD52) und Rituximab (anti-CD20), oder Kombinationstherapien aus Chemotherapeutika und Antikörper konnten deutliche Behandlungsfortschritte erzielen (Cheson, 2006). Trotzdem sind die chronische lymphatische Leukämie (CLL) und niedrig-maligne Non-Hodgkin-Lymphome (NHL), zum Beispiel das follikuläre Lymphom, bisher nicht heilbar. Auch bei den hoch-malignen Lymphomen, wie dem großzelligen B-Zell-Lymphom, kann nur ein Teil der Patienten geheilt werden.

Der neue Therapieansatz zur Redirektion immunologischer Effektorzellen an Tumorzellen durch bispezifische Antikörper stellt dabei eine aussichtsreiche Weiterentwicklung in der Krebsimmuntherapie dar.

### **1.2.1 Prinzip des bispezifischen Ansatzes**

Bispezifische Antikörper bieten eine erfolgversprechende Möglichkeit, Spender-T-Zellen effizient zum Tumor zu dirigieren (Chames & Baty, 2009a; Müller & Kontermann, 2010; Porter et al., 2006). Der bispezifische Ansatz beruht auf Konstrukten, die gegen zwei unterschiedliche Antigene gerichtet sind. Meist werden Epitope auf Tumor- und Effektorzellen (häufig T-Zellen) adressiert. Die dadurch erzwungene Verbrückung der entsprechenden Epitope auf Tumor- und Effektorzelle und somit die räumliche Nähe von Tumor- und Effektorzelle führt zur Aktivierung der T-Zellen und resultiert in einem zytotoxischen Potential, das um etwa drei log-Stufen höher ist als das der monoklonalen Antikörper. Dadurch ist es möglich auch Tumorzellen zu adressieren, deren Antigen nur niedrige Expressionsspiegel aufweist (Buhmann et al., 2009; Stanglmaier et al., 2008).

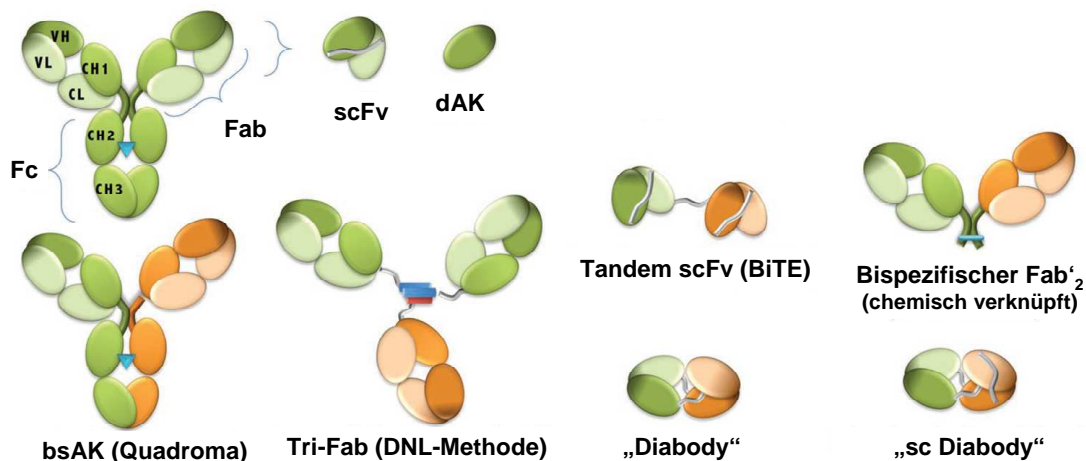
Bispezifische Antikörperkonstrukte, die einen funktionsfähigen Fc-Teil tragen, bieten darüber hinaus die Möglichkeit, akzessorische Zellen, wie dendritische Zellen, Makrophagen oder natürliche Killerzellen, zum Tumor zu lenken (Stanglmaier et al., 2008). Neben der direkten Zerstörung der Tumorzellen kann dies zur Ausbildung einer lang anhaltenden, T-Zell-vermittelten anti-Tumorimmunität führen (Morecki et al., 2008; Ruf & Lindhofer, 2001). Zudem wurde in experimentellen Tumormodellen sowie ersten



klinischen Anwendungen im Kontext der allogenen Transplantation die Möglichkeit der Dissektion von GvL- und GvHD-Effekten diskutiert (Morecki et al., 2006). Es wurde also nicht nur die Redirektion von Effektorzellen hin zu Tumorzellen, sondern gleichzeitig auch weg von GvHD-sensitiven Geweben postuliert.

## 1.2.2 Unterschiedliche Formate der bispezifischen Konstrukte

Bereits zehn Jahre nachdem von Köhler und Milstein mit der Hybridom-Technik ein effizienter Weg zur Produktion monoklonaler Antikörper gefunden wurde, stellte Uwe D. Staerz die Hypothese von Hybrid-Antikörpern vor, die dazu in der Lage sind, simultan zwei verschiedene Ziel-Antigene zu binden (Köhler & Milstein, 1975; Staerz et al., 1985). Und obwohl bispezifische Antikörper in der Natur nicht vorkommen, gibt es mittlerweile einige Ansätze zur Herstellung solcher Konstrukte (siehe Abbildung 1.2).



**Abb. 1.2: Übersicht der verschiedenen Antikörper-Formate.** In grün sind ein konventioneller Antikörper (leichte Kette in hellgrün, schwere Kette in dunkelgrün, das blaue Dreieck deutet die Glykosylierungs-Position an) sowie die abgeleiteten Fragmente dargestellt (schattierte Bereiche zeigen die Antigen-Bindungsstelle). Durch die orange Farbe wird eine unterschiedliche Spezifität der Konstrukte dargestellt. Die roten und blauen Formen stellen die DDD2- und AD2-Peptide der DNL-Methode (= „Dock-and-Lock“-Methode) dar. Alle flexiblen Linker sind in grau abgebildet. Fab = Fab-Fragment, Fv = Fv-Fragment, sc = „single chain“, dAK = Domänen-antikörper, bsAK = bispezifischer Antikörper, BiTE = Bispezifische T-Zell-„Engager“ (Abbildung adaptiert von (Chames & Baty, 2009b)).

Die erste Generation bispezifischer Antikörper entstand mithilfe der Hybrid-Hybridom- oder auch Quadroma-Technologie, der somatischen Fusion zwei verschiedener Hybridom-Zelllinien. Dabei kommt es zu einer zufälligen Paarung von je zwei schweren und leichten Ketten des Antikörpers, was extrem aufwändige Aufreinigungsverfahren nach sich zieht.

Eine deutliche Verbesserung der ursprünglichen Methode wurde 1995 von Lindhofer beschrieben. Durch die Fusion einer IgG2a-produzierenden Hybridom-Zelle der Maus mit einer IgG2b-produzierenden Hybridom-Zelle der Ratte scheint es Spezies-beschränkt zu einer bevorzugten Paarung von schwerer und leichter Kette zu kommen, was große Vorteile im Bezug auf Ausbeute und Aufreinigung mit sich bringt (Lindhofer et al., 1995). Der funktionale Hybrid-Fc-Teil aus Maus und Ratte interagiert zudem effizient mit aktivierenden humanen Fc-Rezeptoren (FcγRI und FcγRIII), während keine Wechselwirkung mit inhibitorischen Fc-Rezeptoren (FcγRIIB) beobachtet wurde (Zeidler et al., 2000; Zeidler et al., 1999). Somit bieten diese bispezifischen Antikörper zusätzlich die Möglichkeit, akzessorische Zellen, wie dendritische Zellen, Makrophagen oder natürliche Killerzellen, zu binden und werden deshalb auch trifunktionale bispezifische Antikörper oder Triomab genannt. Triomabs sind dadurch nicht nur in der Lage, Tumor- und Effektorzelle zu binden, sondern auch dendritische Zellen zu aktivieren, NK-abhängige Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC = „antibody dependent cellular cytotoxicity“) zu induzieren und die Tumorzell-Phagozytose durch Makrophagen zu stimulieren. Somit unterstützen Triomabs auch effizient die Kostimulation von T-Zellen durch den direkten Kontakt mit akzessorischen Zellen, wie Makrophagen und dendritischen Zellen (B7/CD28, CD40/CD40L, LFA3/CD2), oder Zytokin-Sekretion (IL-2, IL-6, IL-12). Als erstes bispezifisches Antikörperkonstrukt wurde im März 2009 Catumaxomab (Removab®) durch die Europäische Arzneimittelagentur (EMA = „European Medicines Agency“) zugelassen (Heiss et al., 2010). Dabei handelt es sich um einen trifunktionalen bispezifischen Antikörper, der gegen das Tumorantigen EpCAM (CD326) und CD3 auf T-Zellen gerichtet ist. Er wird zur Behandlung maligner Aszites von Patienten mit EpCAM-positivem Karzinom eingesetzt, wenn Standard-Therapien nicht mehr zur Auswahl stehen oder nicht durchführbar sind. Diese erste Zulassung ist ein Meilenstein im Bereich der bispezifischen Antikörperkonstrukte. Mit Ertumaxomab (Heiss et al., 2005) und FBTA05 (Buhmann et al., 2009) werden derzeit zwei weitere vielversprechende Triomabs in klinischen Studien geprüft.

Ebenfalls zur ersten Generation bispezifischer Antikörperkonstrukte zählen chemisch verknüpfte Fab-Fragmente. Die Herstellung dieser bispezifischen Fab'<sub>2</sub> erfolgt über enzymatischen Verdau und milde Reduktion zweier parentaler IgG-Moleküle, gefolgt von einer Heterodimerisierung über Thiol-reaktive heterobifunktionale Reagenzien (Glennie et al., 1987). Zurzeit werden einige solcher Moleküle in klinischen Studien geprüft, allerdings kam es bislang noch zu keiner Zulassung.

Die Entwicklung von Techniken zur Herstellung rekombinanter Antikörper revolutionierte auch den Bereich der bispezifischen Antikörperkonstrukte und es entstanden Modelle der zweiten Generation. Im Besonderen die Verwendung von Einzel-Ketten-Fv-Fragmenten (scFv) war die Grundlage für vielseitige Ideen (Müller & Kontermann, 2007). Dazu zählen die sogenannten Tandem-scFv (TaFv), die aus zwei über einen Peptid-Linker verbundenen scFv-Fragmenten bestehen. Dieses Format wurde im Speziellen dazu verwendet, bispezifische T-Zell „Engager“-Moleküle (BiTE) zu entwickeln, die in klinischen Studien bislang vielversprechende Ergebnisse zeigen (Bargou et al., 2008). Eine weitere Form sind die kompakteren „Diabodies“, die durch Verkürzung des Peptid-Linkers entstanden sind (Holliger et al., 1993). Das Format der „Diabodies“ wurde durch einen zusätzlichen Peptid-Linker zwischen den beiden Polypeptiden weiter verbessert. Dadurch kann die Anzahl der gebildeten Homo-Dimere verringert werden. Diese Konstrukte werden Einzel-Ketten-„Diabodies“ (sc Diabodies) genannt und sind derzeit Gegenstand vieler Untersuchungen (Kipriyanov et al., 1999).

Ebenfalls neuartig ist die „Dock-and-Lock“-Methode (DNL-Methode) zur Herstellung trivalenter bispezifischer Moleküle (auch Tri-Fab genannt), die mittlerweile auch in verschiedenen Ansätzen untersucht werden (Goldenberg et al., 2008; Rossi et al., 2006).

### **1.3 Nachteile bei der Verwendung von therapeutischen Antikörpern**

Trotz der großen Fortschritte blieben die klinischen Ergebnisse bislang hinter den Erwartungen zurück (Chames et al., 2009). Die Ursachen dafür liegen vor allem in den stoffimmanenten und verfahrenstechnischen Problemen, die bislang nicht grundsätzlich gelöst werden konnten.

#### **1.3.1 Immunogenität**

Bispezifische Antikörperkonstrukte, die von Maus- oder Rattenantikörpern abgeleitet sind, zeigen in den meisten Fällen eine hohe Immunogenität. Häufig kommt es zur Bildung von humanen anti-Maus (HAMA) oder anti-Ratte (HARA) Antikörpern, was

eine signifikante Wirkabschwächung zur Folge hat (Chames & Baty, 2009b). Die hohe Immunogenität erschwert eine wiederholte Applikation und lässt den Einsatz in nur geringen Dosen zu.

### **1.3.2 Zytokinfreisetzung**

Bei der Verwendung von Heterodimeren mit einem funktionalen Fc-Teil kommt es bei der Bindung an Fc-Rezeptor-tragende akzessorische Zellen häufig zu einer massiven Zytokinfreisetzung und damit verbunden zu unerwünschter Toxizität (Peipp & Valerius, 2002). Das Verträglichkeitsprofil von bispezifischen Antikörperkonstrukten ist somit in vielen Fällen ungünstig.

### **1.3.3 Pharmakokinetik**

Bispezifische Antikörperkonstrukte der zweiten Generation (rekombinant hergestellt) enthalten zwar in der Regel keinen funktionalen Fc-Teil, sind aber deutlich kleiner als die ursprünglichen monoklonalen Antikörper (in der Regel IgG1). Auch wenn das einen Vorteil hinsichtlich der Penetration des Tumorgewebes mit sich bringen kann, ergeben sich daraus ungeeignete pharmakokinetische Eigenschaften. Die geringe Größe von Konstrukten, wie Tandem scFv, „Diabodies“ oder „sc Diabodies“, erschwert den Aufbau konstanter Plasmaspiegel, da sie nach intravenöser Injektion rasch durch renale Clearance aus dem Blutkreislauf ausgeschieden werden, was wiederum zu einer Abschwächung der Wirksamkeit führt (Chames & Baty, 2009a).

### **1.3.4 Produktion**

Für die Herstellung und Aufreinigung bispezifischer Antikörperkonstrukte kommen verschiedene Verfahren zum Einsatz. Allerdings ist jede dieser Methoden aufwendig und kostenintensiv, vor allem in Anbetracht der Tatsache, dass für klinische Evaluationen und die Herstellung von Konstrukten für die Therapie große Mengen von hoher Reinheit und Qualität benötigt werden (Segal et al., 1999).

## **1.4 Lösungsansatz: Übertragung des innovativen Therapieansatzes auf die Stoffklasse der Nukleinsäuren**

Vor dem Hintergrund der stoffimmanenten und verfahrenstechnischen Nachteile der bispezifischen Antikörperkonstrukte erscheint die Übertragung des hochinnovativen Therapiekonzeptes auf die Stoffklasse der Nukleinsäure-Liganden, den sogenannten Aptameren (abgeleitet aus dem Lateinischen: „aptus“ = passend und dem Griechischen: „μέρος“ = (An)teil) interessant. Bei Aptameren handelt es sich um Antikörper-ähnliche Moleküle, die aus hochkomplexen kombinatorischen Nukleinsäure-Bibliotheken durch in vitro Selektion erhalten werden und in der Lage sind, beliebige Zielproteine mit hoher Affinität und Spezifität zu binden. Ihre Bindungsaffinitäten gegenüber Zielproteinen liegen in der Regel im nanomolaren Bereich und sind damit denen von proteinbasierenden Antikörpern vergleichbar.

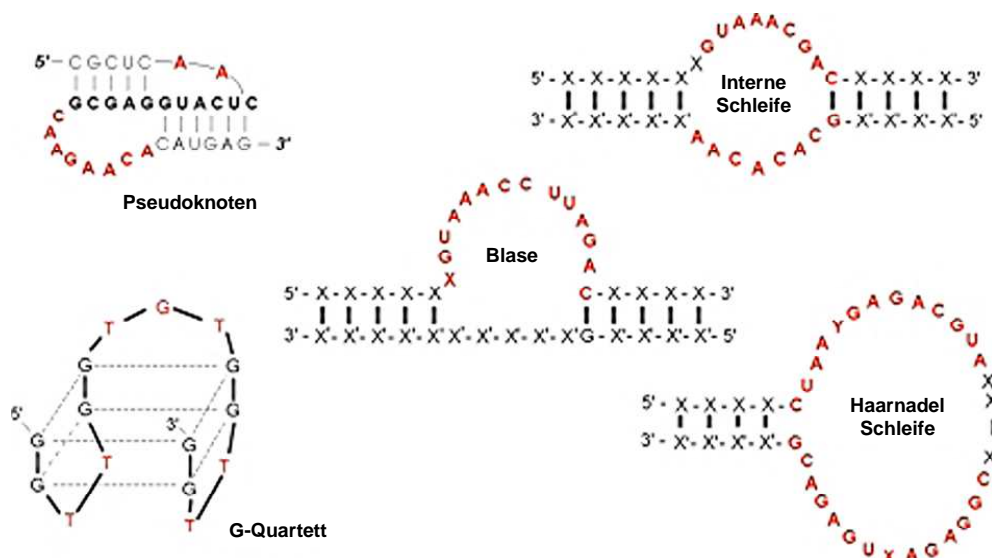
Durch die der Substanzklasse der Nukleinsäuren inhärenten einzigartigen chemischen sowie strukturbedingten Eigenschaften könnten hier mit der Entwicklung von bispezifischen, multivalenten Nukleinsäure-Liganden (Aptameren) wesentliche Fortschritte erzielt und damit die Limitierungen der heterodimeren Antikörper überwunden werden.

### **1.4.1 Aptamere – Antikörper-ähnliche Moleküle**

Aptamere sind synthetische, einzelsträngige DNS- oder RNS-Moleküle, die durch Faltung in dreidimensionale Strukturen spezifisch an ihre Zielmoleküle binden können. Seit ihrer Entdeckung vor 20 Jahren wurden Aptamere inzwischen gegen eine Vielzahl von Zielmolekülen entwickelt, einschließlich membranständiger Proteine (Ellington & Szostak, 1990; Proske et al., 2005; Tuerk & Gold, 1990). DNS- oder RNS-Aptamere werden üblicherweise aus synthetischen, kombinatorischen Nukleinsäurebibliotheken durch in vitro Selektion, das sogenannte SELEX-Verfahren (Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung) gewonnen (siehe 1.4.2).

Aptamere zeichnen sich durch außergewöhnlich hohe Spezifitäten und Affinitäten aus, die denen von Antikörpern gleichen, und können in Analogie zu Antikörpern sowohl in der Diagnostik als auch in therapeutischen Ansätzen angewendet werden. Durch die zusätzliche Einlagerung von bivalenten Kationen mit der Fähigkeit Guaninbasen und

Phosphatgruppen miteinander zu verknüpfen, haben Aptamere in Lösung einen hohen Grad an molekularer Starrheit. Dadurch haben sie das Potenzial, das jeweilige Zielmolekül mit hoher Genauigkeit zu erkennen und mit großer Affinität und Spezifität zu binden. Die auf dem Schlüssel-Schloss-Prinzip basierende Bindung der Aptamere wird vor allem von ihrer Sekundärstruktur bestimmt. Diese hängt wiederum sehr stark von der Sequenz ab, das heißt von der Reihenfolge der Basen Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin (im Falle von DNS) bzw. Uracil (im Fall von RNS). Als Sekundärstrukturen werden beispielsweise *Haarnadel-Schleifen*, *Pseudoknoten* und *G-Quartette* beschrieben (siehe Abbildung 1.3).



**Abb. 1.3: Mögliche Sekundärstrukturen von Aptameren.**

Aptamere können nicht nur an Proteine binden, deren natürliche Aufgabe darin besteht, mit Nukleinsäuren zu interagieren (z. B. Polymerasen), sondern erkennen auch Proteine, die natürlicherweise keine Nukleinsäuren binden (z. B. Wachstumsfaktoren, Antikörper oder Hormone (Jellinek et al., 1993; Lin et al., 1996; Tsai et al., 1992; Tuerk & Gold, 1990)). Einige der affinsten Aptamere haben Dissoziationskonstanten im Bereich von 100 pM (Jellinek et al., 1995; Jellinek et al., 1993). Ferner sind Aptamere durch ihre auffallende Spezifität dazu in der Lage, Zielmoleküle auch anhand feinsten struktureller Unterschiede zu erkennen. So gibt es Aptamere, die die An- bzw. Abwesenheit einer Methyl- bzw. Hydroxygruppe registrieren oder das D- und L-Enantiomer kleiner organischer Verbindungen voneinander unterscheiden können (Geiger et al., 1996; Jenison et al., 1994; Sassanfar & Szostak, 1993). Durch die Verwendung von 2'-Fluoro- oder 2'-Amino-Mononukleotid-Triphosphat modifizierten RNS-Bibliotheken ist es möglich, RNase-resistente RNS-Aptamere zu gewinnen (Eaton & Pieken, 1995). Solche modifizierten,

stabilisierten Aptamere können auch in biologischen Flüssigkeiten (Blut, Urin) als Sonde fungieren (Pieken et al., 1991).

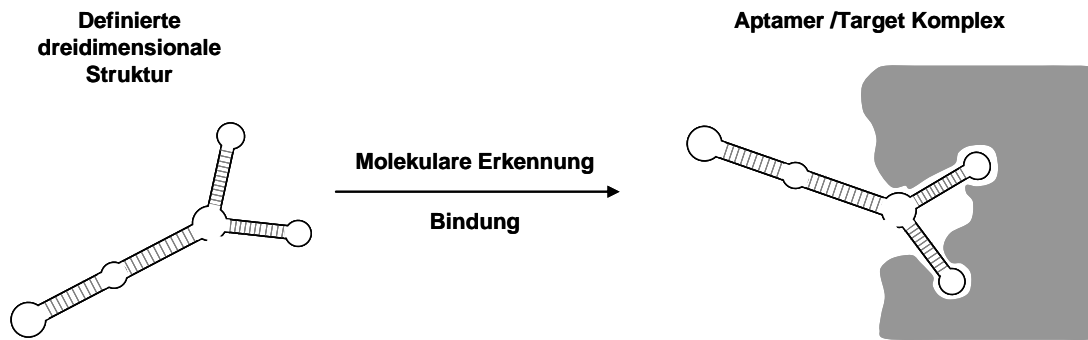
#### **1.4.2 Identifizierung von Aptameren durch systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (SELEX)**

Aptamere werden durch die SELEX-Methode aus riesigen Nukleinsäurebibliotheken gewonnen. Dieser in vitro evolutive Prozess wurde 1990 zeitgleich von Larry Gold und Andrew E. Ellington entwickelt (Ellington & Szostak, 1990; Tuerk & Gold, 1990). In beiden Ansätzen wurden RNS-Moleküle eingesetzt. Zwei Jahre später wurden die ersten DNS-Liganden mithilfe der SELEX-Methode selektiert (Bock et al., 1992; Ellington & Szostak, 1992).

##### **1.4.2.1 SELEX – eine Methode der kombinatorischen Chemie**

Die SELEX zählt zu den kombinatorisch-chemischen Methoden, die die Identifizierung einzelner Moleküle mit der Eigenschaft ermöglichen, als Ligand gegen eine bestimmte Zielstruktur fungieren zu können (Wennemers, 2001). Die SELEX-Methode basiert dabei auf der Isolierung von funktionalen, einzelsträngigen Nukleinsäure-Liganden (ssDNS oder RNS) aus riesigen Bibliotheken mit bis zu  $10^{15}$  Molekülen (Gold et al., 1995). Vergleicht man diese Vielfalt mit anderen kombinatorischen Bibliotheken – wie z. B. Phagen-Display mit bis zu  $10^{11}$  auf Phagen präsentierten Peptiden oder mit dem Immunrepertoire des Menschen (etwa  $10^{11}$  Immunglobuline) – bedient sich SELEX einer Startbibliothek von derartiger Vielfalt, dass in ihr die Anwesenheit von Liganden gegen praktisch jede beliebige Zielstruktur implementiert werden kann (Sidhu, 2000).

Die Basenabfolge der einzelsträngigen Nukleinsäuremoleküle einer SELEX-Bibliothek ist zufällig und wird von definierten Sequenzen flankiert, die für die Primererkennung notwendig sind. Durch die Ausbildung von intramolekularen Basenpaaren kann jedes Molekül eine individuelle dreidimensionale Form einnehmen. Diese Strukturen können nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip die Oberfläche von Zielmolekülen erkennen und fest an sie binden (siehe Abbildung 1.4).



**Abb. 1.4:** Schematische Darstellung der gezielten Bindung eines Aptamers mit individueller dreidimensionaler Struktur an seine Zielstruktur nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip.

Durch die konformelle Komplexität kann eine SELEX-Bibliothek als Quelle von Aptameren gegen eine große Vielfalt an Zielstrukturen herangezogen werden. Bis dato wurde die SELEX-Technik erfolgreich gegen vielfältige Molekülklassen eingesetzt, darunter Peptide, Aminosäuren, kleine organische Moleküle, Polysaccharide und Proteine (Ellington & Szostak, 1990; Famulok, 1994; Jenison et al., 1994; Lato et al., 1995; Majerfeld & Yarus, 1994; Nieuwlandt et al., 1995; Tuerk et al., 1992; Williams et al., 1997).

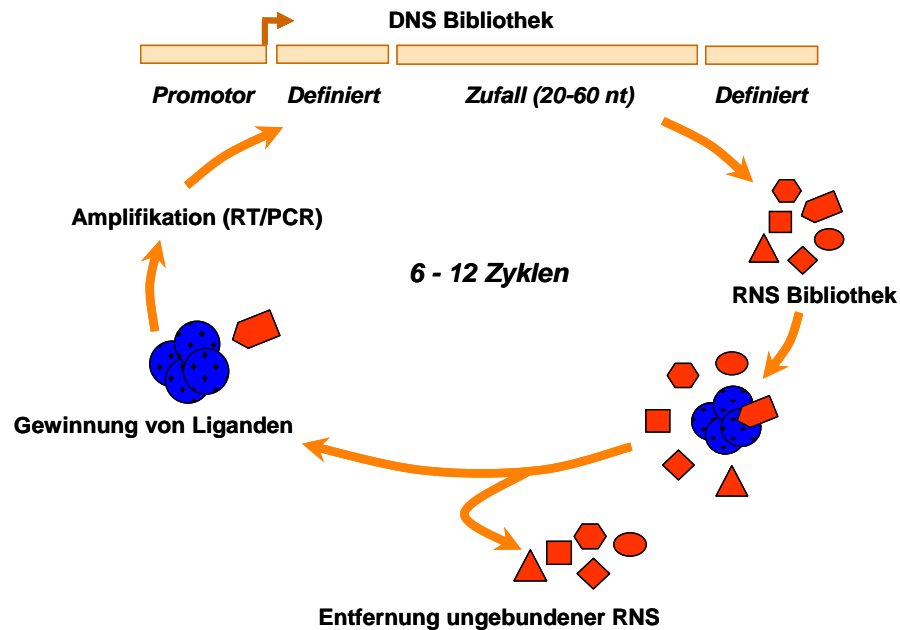
#### 1.4.2.2 Der SELEX-Prozess

Ausgang einer SELEX ist eine synthetische ssDNS-Bibliothek mit zufälliger Basenfolge, (in der Regel 20-200 Nukleotide) flankiert von definierten Sequenzen (am 5'- und am 3'-Ende), die für die Primererkennung wichtig sind. Für den Fall einer RNS-basierten SELEX dient diese ssDNS-Bibliothek zunächst als Transkriptionsschablone zur Herstellung einer RNS-Bibliothek. Durch den Einbau eines 5'-Primers mit Promotorsequenz für die anschließende in vitro Transkription erhält man eine entsprechende RNS-Bibliothek. Für die Zufallssequenz zwischen den konstanten Regionen gibt es bei  $n$  Nukleotiden  $4^n$  Möglichkeiten. Bei  $n = 25$  besteht die Startbibliothek also aus etwa  $10^{15}$  Sequenzen.

Der SELEX-Prozess ist in Abbildung 1.5 am Beispiel einer RNS-SELEX schematisch dargestellt. Er besteht aus iterativen Zyklen von:

- Selektion
  - Separation
  - Amplifikation
- } 6 - 12 x





**Abb. 1.5: Schematische Darstellung einer RNS-SELEX.** Der SELEX-Prozess setzt sich aus 6 - 12 Zyklen von Selektion (Inkubation der Nukleinsäure-Bibliothek mit dem Zielprotein (in blau dargestellt)), Separation (Abtrennung ungebundener Nukleinsäuren) und Amplifikation (Vervielfältigung der Protein-assoziierten Nukleinsäuresequenzen) zusammen. In jedem neuen Zyklus wird eine Ausgangsbibliothek von eingeschränkter Vielfalt und erhöhter Affinität für das Zielprotein eingesetzt.

Unter der Selektion versteht man die Inkubation der Nukleinsäuresequenzen mit der Zielstruktur. Die Bedingungen (Temperatur, pH-Wert usw.) dafür werden so gewählt, dass sie dem gewünschten Einsatzgebiet der identifizierten Aptamere entsprechen. Die Zielstruktur kann dabei immobilisiert sein oder sich in Lösung befinden.

Die Separation der Polynukleotide mit Affinität bezüglich des eingesetzten Zielmoleküls von denen ohne substanzielle Affinität ist ein Schlüsselschritt im SELEX-Prozess. Befanden sich die Zielproteine in Lösung, erfolgt die Separation üblicherweise durch Filtration über Nitrozellulose. Bei, zum Beispiel über magnetische Kügelchen, immobilisierten Zielstrukturen werden die Kügelchen samt gebundenen Sequenzen über einen Magneten von den nicht gebundenen getrennt. Durch Waschschrte werden freie und schwach gebundene Polynukleotide entfernt.

Anschließend erfolgt die Amplifikation der Protein-assoziierten Nukleinsäuresequenzen durch die Zugabe von Bibliothek-spezifischen Primern über eine Polymerase-Kettenreaktion (siehe 3.1.1). Durch den Einbau von biotinylierten 3'-Primern können die biotinylierten Matrizenstränge über eine anschließende Strangtrennung abgetrennt werden und man erhält die Bibliothek der nächsten Selektionsrunde (Beutel & Gold, 1992). Im Fall einer RNS-basierten SELEX werden die selektierten RNS-Sequenzen

zur Verstärkung mittels PCR zunächst in cDNS transkribiert. Das dsDNS-PCR-Produkt mit RNS-Polymeraseaktivität eines Stranges dient dann wieder als Transkriptionsschablone zur Erzeugung der RNS-Bibliothek der nächsten Selektionsrunde. Verglichen mit der Startbibliothek, ist die neue Bibliothek mit Liganden höherer Affinität bezüglich des eingesetzten Zielmoleküls angereichert.

Wiederholte Zyklen von Selektion, Separation und Amplifikation setzen den Evolutionsprozess fort. Bei erneuter Inkubation der neuen Bibliothek der nächsten Selektionsrunde mit dem Zielmolekül gewinnen Aptamere mit höherer Affinität den Wettkampf um die freien Bindungsplätze. Aptamere mit niedrigerer Bindungsaffinität scheiden hingegen aus dem in vitro Selektionsprozess aus. In den aufeinanderfolgenden Zyklen setzen sich letzten Endes die Aptamere mit der höchsten Affinität durch. Nach dem letzten Zyklus werden die isolierten Aptamere durch Klonierung und Sequenzierung analysiert und in weiteren Experimenten hinsichtlich Struktur, Bindungsregion und -affinität genauer charakterisiert.

### **1.4.3 Allgemeine Vorteile von Aptameren gegenüber Antikörpern**

Seit Kohler und Milstein 1975 von der Entdeckung der monoklonalen Antikörpertechnologie berichtet haben, wurde die immunologische Forschung revolutioniert und die Anwendung von Antikörpern auf viele Bereiche der Diagnostik und Therapie ausgeweitet. Allerdings gibt es stoffimmanente und verfahrenstechnische Probleme, die bislang nicht grundsätzlich gelöst werden konnten (siehe 1.3). Alternativ können die viel kleineren Aptamere dazu herangezogen werden, die Unzulänglichkeiten der Peptid-vermittelten Erkennung über Antikörper zu umgehen. Aptamere bieten in diesem Zusammenhang eine Reihe von Vorteilen gegenüber Antikörpern.

Aptamere können in einem in vitro Prozess identifiziert werden, der nicht von Tieren, Zellen oder in vivo Bedingungen abhängig ist (Luzi et al., 2003). Dadurch kann praktisch jedes Molekül als Zielstruktur dienen, auch stark toxische Komponenten. Die Selektionsbedingungen, wie Temperatur, pH-Wert, Salzgehalt, physiologische oder nicht physiologische Puffer, können, je nach späterem Einsatzgebiet der Aptamere, individuell angepasst werden, sodass die entsprechenden Anforderungen erfüllt werden. Gleichmaßen ist es möglich, kinetische Parameter, wie die „An- und Ausrate“, von Aptameren durch Temperatur- bzw. pH-Wechsel oder durch Änderung der Salzkonzentration des Puffers zu steuern (O'Sullivan, 2002).

Außerdem bestechen Aptamere durch die Vorteile einer einfachen chemischen Synthese, die einen hohen Grad an Genauigkeit und Reproduzierbarkeit bietet (Luzi et al., 2003). Sie werden unter stringenten, denaturierenden Bedingungen gereinigt und überzeugen daher durch einen hohen Reinheitsgrad. Aus diesem Grund wird bei der Aptamerproduktion keine Variation zwischen unterschiedlichen Chargen erwartet (Kawazoe et al., 1996). Die Denaturierung von Aptameren ist reversibel. Einmal denaturiert, lassen sich funktionale Aptamere innerhalb von Minuten regenerieren (O'Sullivan, 2002). Sie können über einen sehr langen Zeitraum stabil aufbewahrt und problemlos transportiert werden.

Aptamere binden dreidimensionale Epitope, bevorzugt in kleinen Spalten oder Hohlräumen der Zielmoleküle, während Antikörper nur gut zugängliche Epitope erkennen. Häufig sind genau diese Spalten die funktionalen oder aktiven Bereiche von Proteinen. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit eines funktionalen Aptamers (aktivierend oder inhibierend) deutlich höher als bei Antikörpern.

Zudem gibt es vielfältige chemische Modifikations-, Stabilisierungs- und Multimerisierungsmöglichkeiten, die in der Substanzklasse der Nukleinsäuren begründet liegen. So können Reporter- oder Adaptermoleküle, wie beispielsweise Fluorescein bzw. Biotin, punktgenau an definierte Stellen des Aptamers angebracht werden (Drolet et al., 1996). Ferner lassen sich auch post-SELEX Modifizierungen zur Stabilisierung der Aptamere gegenüber hohen Temperaturen oder enzymatischem Verdau durchführen (Green et al., 1995; Osborne et al., 1996).

Im Gegensatz zur Antikörpertechnologie ermöglicht das Verfahren der in vitro Selektion zudem die Entwicklung kreuzreaktiver Nukleinsäure-Liganden, d.h. Aptamere die gleichermaßen humane wie spezieübergreifende Zielstrukturen erkennen können. Dies erleichtert die präklinische Validierung der bispezifischen Konstrukte. Darüber hinaus ist die Stoffklasse der Nukleinsäuren durch ein geringes immunogenes Potential gekennzeichnet (Bouchard et al., 2010; Keefe et al., 2010).

Trotz der vielversprechenden Aussichten steht die Aptamer-Forschung noch am Anfang – sie holt jedoch in großen Schritten auf. So ist es sehr wahrscheinlich, dass Aptamere eine breite Anwendung in standardisierten diagnostischen Tests finden werden. Und auch der therapeutische Einsatz von Aptameren ist naheliegend und wird derzeit intensiv untersucht (Bouchard et al., 2010; Keefe et al., 2010; Ni et al., 2011) (siehe 1.4.4).

Die Tabelle 1.1 fasst den Vergleich von Aptamer- und allgemeiner Antikörper-Technologie anhand der wichtigsten Punkte zusammen.

**Tabelle 1.1: Vergleich von Aptamer- und Antikörper-Technologie.**

	<b>Aptamer</b>	<b>Antikörper</b>
<b>Produktionszeit</b>	Acht Wochen (acht Zielmoleküle)	Mindestens drei Monate
<b>Synthese</b>	Chemisch oder in vitro; verschiedene Modifizierungen möglich	Produktion in Zellkultur
<b>Spezifität und Affinität</b>	Hoch, $K_d$ im niedrig nanomolaren Bereich	Hoch, $K_d$ im niedrig nanomolaren Bereich
<b>Inhibitorisches Potential</b>	Hoch: 50 % Inhibitoren der Protein-Funktion	Niedrig: nur etwa einer aus 200
<b>Protein-Bindungs-Stelle</b>	Hohlräume und Spalten, dreidimensionale Epitope	Exponierte Epitope
<b>Immunogenität / Toxizität</b>	Bisher nicht beobachtet	Risiko von Immunreaktionen

#### 1.4.4 Aptamere in der Therapie

Aufgrund der vielseitigen Vorteile gegenüber Antikörpern und den interessanten Eigenschaften sind Aptamere sehr interessant für die Entwicklung von Therapeutika. In der Zwischenzeit erreichte eine Reihe von DNS- und auch RNS-Aptameren, gerichtet gegen unterschiedliche Zielstrukturen, das Stadium der klinischen Prüfung. Besonders hervorzuheben ist dabei der Erfolg des RNS-Aptamers Pegaptanid, das bereits im Dezember 2004 als erstes therapeutisches Aptamer durch die FDA („Food and Drug Administration“) zur Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) für den amerikanischen Markt zugelassen wurde. Seit Mai 2006 ist Pegaptanid auch in Deutschland zugelassen (Mayer & Famulok, 2007). Im Rahmen einer Phase III Studie wird derzeit zusätzlich der Einsatz von Pegaptanid zur Therapie von diabetischer Retinopathie untersucht. Und auch viele weitere erfolgversprechende Ansätze befinden sich derzeit im präklinischen Stadium oder werden mittlerweile in klinischen Studien geprüft (Burmeister et al., 2006; Keefe et al., 2010; Lee et al., 2006; Nimjee et al., 2005; Shaw et al., 2008).

Die Tabelle 1.2 gibt eine Übersicht über die jüngsten klinischen Studien von DNS- und RNS-Aptameren.

**Tabelle 1.2: DNS- und RNS-Aptamere in jüngsten klinischen Studien.**

Name	Nukleotid	Zielstruktur	Indikation	Phase	Firma
Pegaptanid (Macugen)	RNS	VEGF-165	AMD; Diabetische Retinopathie	FDA zugel.; III	Pfizer / Eyetech Pharmaceuticals
AS1411	DNS	Nukleolin	AML	II	Antisoma / Archemix Corp.
REG1 (RB006/RB007)	RNS	Faktor IXa	CAD	II	Regado Biosciences / Archemix Corp.
ARC1779	DNS	vWF	TMA	II	Archemix Corp.
NU172	DNS	Thrombin	Herzerkrankung	II	ARCA biopharma / Archemix Corp.
NOX-A12	RNS	CXCL12	Autologe HSZT	I	NOXXON Pharma
NOX-E36	RNS	CCL2	Diabetes mellitus Typ 2	I	NOXXON Pharma
ARC1905	RNS	C5	AMD	I	Ophthotech Corp. / Archemix Corp.
E10030	DNS	PDGF-B	AMD	II	Ophthotech Corp. / Archemix Corp.

Abkürzungen: AMD = Altersbedingte Makuladegeneration; AML = Akute myeloische Leukämie; C5 = Komplementkomponente C5; CAD = Koronare Arterienkrankheit („Coronary artery disease“); CCL2 = Chemokin (CC-Motiv) Ligand 2; CXCL12 = CXC-Motiv-Chemokin 12; Faktor IXa = Coagulationsfaktor IXa; FDA = „Food and Drug Administration“ (behördliche Lebensmittelüberwachung und Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten); PDGF-B = „Platelet-derived growth factor B“; TMA = Thrombotische Mikroangiopathie; VEGF-165 = „Vascular Endothelial Growth Factor 165“; vWF = von-Willebrand-Faktor.

## 1.5 Zielsetzung der Dissertation

Die größte Herausforderung im Kontext der HSZT besteht darin, eine GvHD-Reaktion zu verhindern, ohne dabei den wichtigen GvL-Effekt zu beeinflussen. In diesem Zusammenhang war das Ziel der vorliegenden Arbeit, das therapeutische Potential der innovativen Stoffklasse von Aptameren zu untersuchen.

Die Immunsuppression spezifischer gegen GvHD-reaktive Zellen zu machen, ist dafür ein möglicher Ansatz. Da die CD40L-CD40-Interaktion in der Entstehung der GvHD eine bedeutende Rolle spielt (Durie et al., 1994a), könnte die direkte Blockade dieser Interaktion eine GvHD unterdrücken, ohne gleichzeitig Zellen zu supprimieren, die keine Gefahr darstellen. Vor diesem Hintergrund war ein wichtiges Ziel dieser Arbeit, CD40L-spezifische DNS-Aptamere, die vorab innerhalb der Gruppe selektiert wurden, auf molekularer und durchflusszytometrischer Ebene zu charakterisieren, um interessante Klone für funktionale Analysen im zellulären System zu identifizieren. Die Aptamere wurden dafür hinsichtlich ihrer Spezifität, Stabilität und Affinität untersucht. Zudem sollte der Bindungsbereich der Aptamere an das Zielprotein eingegrenzt werden und eine mögliche Verkürzung der Aptamere untersucht werden, die bislang eine Länge von 80 Basen hatten. Auch die Etablierung eines geeigneten zellulären Systems zur funktionalen Untersuchung der Aptamere sowie die Validierung des inhibitorischen Potentials der Aptamere innerhalb dieses Systems waren wichtige Ziele dieser Arbeit.

Ein weiterer, sehr aussichtsreicher Therapieansatz ist die Redirektion von immunkompetenten Zellen, weg von GvHD-sensitiven Geweben hin zu leukämischen Zellen. Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Übertragung dieses Konzeptes auf die Stoffklasse der Nukleinsäure-Liganden konzeptionell angelegt werden. Dafür wurden mit DNS-Modellaptameren aus der Literatur wichtige Machbarkeitsuntersuchungen zur Verbrückung von zwei verschiedenen Zelltypen über bispezifische multivalente Aptamere sowie der dadurch vermittelten zytolytischen Aktivität durchgeführt.

Darüber hinaus wurden innerhalb der Arbeitsgruppe auch CD40L-spezifische RNS-Aptamere selektiert. RNS-Aptamere sind in der Möglichkeit ihrer dreidimensionalen Strukturen diverser und können gegen den Abbau durch Nukleasen stabilisiert werden. In Analogie zu den DNS-Aptameren sollten auch die 2'-Fluoro-RNS-Aptamere hinsichtlich ihrer Spezifität, Affinität und Stabilität charakterisiert werden.

## 2 Material

Die zur normalen Laboreinrichtung gehörenden Glas- und Plastikutensilien werden hier nicht gesondert aufgeführt.

### 2.1 Zellen

#### 2.1.1 Blutproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Versuche humane periphere mononukleäre Blutzellen („Peripheral Blood Mononuclear Cell“, PBMC) sowie isolierte T-Lymphozyten (CD3+), CD4-positive T-Lymphozyten (CD4+, CD3+) und B-Lymphozyten (CD19<sup>+</sup>, CD20+) verwendet. Diese wurden aus je 25 bis 100 ml Heparinblut von gesunden und freiwilligen Spendern isoliert. Die Abnahme erfolgte von einem zur Blutabnahme berechtigten Mediziner. Die Zustimmung der lokalen Ethikkommission lag vor.

#### 2.1.2 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Quelle
Jurkat	Humane T-Zell-Lymphom-Zelllinie	ATCC-LGC Standards GmbH, Wesel/D
Raji	Humane Burkitt-Lymphom-Zelllinie	Leibniz Institut DSMZ GmbH, Braunschweig/D
Ramos	Humane Burkitt-Lymphom-Zelllinie	ATCC-LGC Standards GmbH, Wesel/D

## 2.2 Fluoreszenzmarkierte Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Konjugation	Klon	Isotyp	Hersteller
CD3	FITC, PE-Cy7	UCHT1	IgG1	Beckman Coulter™, Marseilles/F
CD3	PE, APC	S4.1	IgG2a	BD Pharmingen™, Heidelberg/D
CD4	FITC, APC	S3.5	IgG2a	Invitrogen™, Karlsruhe/D
CD8	PE	RPA-T8	IgG1	BD Pharmingen™, Heidelberg/D
CD8	APC	3B5	IgG2a	Invitrogen™, Karlsruhe/D
CD19	PE	HIB19	IgG1	BD Pharmingen™, Heidelberg/D
CD20	FITC	HI47	IgG3	Invitrogen™, Karlsruhe/D
CD80	FITC	L307.4	IgG1	BD Pharmingen™, Heidelberg/D
CD86	FITC	BU63	IgG1	Invitrogen™, Karlsruhe/D
CD86	PE	2331	IgG1	BD Pharmingen™, Heidelberg/D
CD95	FITC	UB2	IgG1	Beckman Coulter™, Marseilles/F
CD95	PE	DX2	IgG1	BD Pharmingen™, Heidelberg/D
CD154 (CD40L)	FITC	MK13A4	IgG1	AbD Serotec, Düsseldorf/D
CD154 (CD40L)	PE, APC	TRAP1	IgG1	BD Pharmingen™, Heidelberg/D
Isotypen- kontrolle	FITC, PE, APC	MOPC-21	IgG1	BD Pharmingen™, Heidelberg/D
	FITC, PE-Cy7	679.1Mc7	IgG1	Beckman Coulter™, Marseilles/F

## 2.3 Modifizierte Nukleotide

Produkt	Hersteller
2'-Fluorine-dCTP (2'-F-dCTP)	Epicentre® Biotechnologies, Madison, WI/USA
2'-Fluorine-dUTP (2'-F-dUTP)	Epicentre® Biotechnologies, Madison, WI/USA
$\alpha$ -[ <sup>32</sup> P]-GTP 111TBq (3000Ci)/mmol 370MBq (10mCi)/ml	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig/D
$\gamma$ -[ <sup>32</sup> P]-ATP 111TBq (3000Ci)/mmol 370MBq (10mCi)/ml	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig/D



## 2.4 Oligonukleotide

### 2.4.1 Primer

Die Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion wurden von Metabion, Martinsried/D bzw. BioSpring GmbH, Frankfurt a. M./D synthetisiert und nach HPLC-Reinigung als Stammlösungen in einer Konzentration von 100 pmol/μl geliefert.

#### Primer für Vollängen-Aptamere:

Bezeichnung	Sequenz
3-Primer: 3'-DC4-Bio	5'- Biotin -TAC CTG AAG TCT GGA GTC TA -3'
5'-Primer: 5'-DC4	5'- AGC ATA GAG ACA TCT GCT AT -3'
3-Primer: 3'-P1.20	5'- CCA TCC ACC GTG AGG ACA AA -3'
5'-Primer: 5'-P1.45 (mit T7-Promotor = fett)	5'- AAT TCT <b>AAT ACG ACT CAC TAT</b> AGG GAG GAG GAG AGA TGT GAA CTT -3'

#### Primer für die Verkürzung der DNS-Aptamere:

##### 1) Verkürzung vom 5'-Ende:

Bezeichnung	Sequenz
3-Primer: 3'-DC4-Bio	5'- Biotin -TAC CTG AAG TCT GGA GTC TA -3'
5'-Primer: 5'-tDC4-10	5'- CAT CTG CTA TCC TTG GCT -3'
5'-Primer: 5'-tDC4-20	5'- CC TTG GCT CAG GTC CC -3'
5'-Primer: 5'-tDC4-24	5'- G GCT CAG GTC CCT CT -3'
5'-Primer: 5'-tDC4-26	5'- CT CAG GTC CCT CTC TC -3'

##### 2) Verkürzung vom 3'-Ende:

Bezeichnung	Sequenz
3-Primer: 3'-tDC4-10-Bio	5'-Biotin- CTG GAG TCT AGG ATG GAG -3'
3-Primer: 3'-tDC4-20-Bio	5'-Biotin- GG ATG GAG CCG CAT AC -3'
3-Primer: 3'-tDC4-28-Bio	5'-Biotin- CCG CAT ACC GGA GAG A -3'
3-Primer: 3'-tDC4-30-Bio	5'-Biotin- G CAT ACC GGA GAG AGG -3'

3-Primer: 3'-tDC4-33-Bio	5'-Biotin- T ACC GGA GAG AGG GAC -3'
3-Primer: 3'-tDC4-36-Bio	5'-Biotin- C GGA GAG AGG GAC CT -3'
3-Primer: 3'-tDC4-39-Bio	5'-Biotin- A GAG AGG GAC CTG AGC -3'
3-Primer: 3'-tDC4-42-Bio	5'-Biotin- G AGG GAC CTG AGC CAA -3'
5'-Primer: 5'-DC4	5'- AGC ATA GAG ACA TCT GCT AT -3'

## 2.4.2 Startbibliotheken

Die Startbibliotheken wurden von BioSpring GmbH, Frankfurt a. M./D synthetisiert und nach HPLC-Reinigung als Stammlösungen in einer Konzentration von 100 pmol/μl geliefert. (N = beliebige Base (ACGT)).

Bezeichnung	Sequenz
D40	5'- AGCATAGAGACATCTGCTAT NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN N TAGACTCCAGACTTCAGGTA -3'
N47Ny	5'- GGGAGGAGGAGAGATGTGAAC TT NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NN AG TTTGTCTCACC GTTGGATGG -3'

## 2.4.3 DNS-Aptamere und DNS-Matrizen für RNS-Aptamere

Die Matrizen für die Herstellung von DNS- oder RNS-Aptameren wurden von Metabion, Martinsried/D bzw. BioSpring GmbH, Frankfurt a. M./D synthetisiert und nach HPLC-Reinigung als Stammlösungen in einer Konzentration von 100 pmol/μl geliefert.

### Sequenzen der DNS-Aptamere:

Bezeichnung	Sequenz
S51A-C1	5'- AGCATAGAGACATCTGCTAT CAC GCA CAC TAG ACC CAT TGC ACA CCA TTC CGC CGA CTT C TAGACTCCAGACTTCAGGTA -3'
S51A-C2	5'- AGCATAGAGACATCTGCTAT GCC GTC ACT CTC CAG CTT GAT TCG AGG ACG TAC GGG CGA C TAGACTCCAGACTTCAGGTA -3'
S51A-C3	5'- AGCATAGAGACATCTGCTAT CGG AGC CGG ATT TGA TGC TTC GAC CCA CCT GGA CCC CGT G TAGACTCCAGACTTCAGGTA -3'
S51A-C5	5'- AGCATAGAGACATCTGCTAT ACG ACT TCC TTG CCT CCA GAC TCC CGT TAG ACG ACC AGC C TAGACTCCAGACTTCAGGTA -3'

S51A-C7	5' – AGCATAGAGACATCTGCTAT <b>CCT ACC AAT CCT GTA CTT TGG TTC CGC TTT GTC TCG ACC C</b> TAGACTCCAGACTTCAGGTA –3'
S51A-C8	5' – AGCATAGAGACATCTGCTAT <b>CGA CGA ATC CAA TCT TTC GAC GCG CTT CAA CTC GCT ATG C</b> TAGACTCCAGACTTCAGGTA –3'
S51A-C10	5' – AGCATAGAGACATCTGCTAT <b>CCT TGG CTC AGG TCC CTC TCT CCG GTA TGC GGC TCC ATC C</b> TAGACTCCAGACTTCAGGTA –3'
S51A-C10scr	5' – <b>ACC TTT GAA TTG GCA GCC CCT CTA GTC GTC CGG CTG ATC CCA CGT GCA TGA CCT AGC TTC ATC AGC CAC AGT GAG ATT CT</b> –3'
S51A-C10-28	5' – AGCATAGAGACATCTGCTAT <b>CCT TGG CTC AGG TCC CTC TCT CCG GTA TGC GG</b> –3'
S51A-C10-28scr	5' – <b>ACC TTT GAA TTG GCA GCC CCT GTA GTC GTC CGG CTG ATC CCA CGT GCA TGA T</b> –3'
S51A-C11	5' – AGCATAGAGACATCTGCTAT <b>ACC ACA TCG CAA GCC CGA ACA CAT CCC CAC GTC TTA GGC C</b> TAGACTCCAGACTTCAGGTA –3'
S51A-C13	5' – AGCATAGAGACATCTGCTAT <b>CCG TAT CTT AGC ACC GCC CAG GGG AGT GGC TTC TAG TGT G</b> TAGACTCCAGACTTCAGGTA <b>GCC TCG GGG</b> –3'
S51A-C15	5' – AGCATAGAGACATCTGCTAT <b>CCG GAC CTT AGC ATC CTT GGC TCG CCT ATG TAC TGG TAA C</b> TAGACTCCAGACTTCAGGTA –3'
TD05 (Mallikaratchy et al., 2007)	5' – <b>AAG GAG CAG CGT GGA GGA TAA ACA CCG TGG AGG ATA GTT CGG TGG CTG TTC AGG GTC TCC TCC CGG TGT TAG GGT GTG TCG TCG TGG T</b> –3'
Sgc8c (Shangguan et al., 2008)	5' – <b>ATC TAA CTG CTG CGC CGC CGG GAA AAT ACT GTA CGG TTA GA</b> –3'

### Sequenzen der Matrizen der RNS-Aptamere:

Bezeichnung	Sequenz
S132E-C4	5' – GGGAGGAGGAGAGATGTGAACTT <b>GGA GAC GGT ACC CAG GAC ACC ATT AAA TAA GCG ATA CTA CCG GCG TA</b> AG TTTGTCCTCACGGTGGATGG –3'
S132E-C9	5' – GGGAGGAGGAGAGATGTGAACTT <b>AAA GTT GAC ACC CAG GAA CCA AAG AAC TAT GAA CCA TGT CAA CAG TC</b> AG TTTGTCCTCACGGTGGATGG –3'
S132E-C11	5' – GGGAGGAGGAGAGATGTGAACTT <b>AAA GAA AGG AAC CCA GGA CGC CAA ATT TGA AAC GAA TTC CTT TAA CTG</b> AG TTTGTCCTCACGGTGGATGG –3'
S132E-C12	5' – GGGAGGAGGAGAGATGTGAACTT <b>CAG AAG CAC ACG GTT TCG GGG GAG GAG GGC TAG AAA CCA AAC ATA AC</b> AG TTTGTCCTCACGGTGGATGG –3'

S132E-C16	5' – GGGAGGAGGAGAGATGTGAACTT AAC TGC AGC AAA AAC CGA AAC GAG GGC ACC CAC AAC CCT GAT TAA G AG TTTGTCTCACGGTGGATGG –3'
S132E-C20	5' – GGGAGGAGGAGAGATGTGAACTT GAT TGA CGC TGC CCA GGA TAA CCA CAT TCA TTT ATA CAG CGT GTA TC AG TTTGTCTCACGGTGGATGG –3'
S132E-C26	5' – GGGAGGAGGAGAGATGTGAACTT GGC CCA GGA TAC CAG ACG ACA GCA GCA ACC ATT TTC ACA CGC ACA GA AG TTTGTCTCACGGTGGATGG –3'
S132E-C28	5' – GGGAGGAGGAGAGATGTGAACTT TAG AGG AGC ACC CAA CAA CCT TAA CTG AAC TAC ACT GCT TCT TGA AAA AG TTTGTCTCACGGTGGATGG –3'
S132E-C31	5' – GGGAGGAGGAGAGATGTGAACTT GAC CCA GAA AGA CCA CAC TGA AAT TTA ACA ATC AAG TTC CAG CCT T AG TTTGTCTCACGGTGGATGG –3'
S132E-C34A	5' – GGGAGGAGGAGAGATGTGAACTT TAG CGC CCA GAA TTA CCA AAT TAA GTA TAA CCG CAT AAG TAA GCT CC AG TTTGTCTCACGGTGGATGG –3'
S132E-C34B	5' – GGGAGGAGGAGAGATGTGAACTT TAG CGC CCA GAA TTA CCA AAT TAA GTA TAA CCG CAT AAG TAA GCA CC AG TTTGTCTCACGGTGGATGG –3'
S132E-C42	5' – GGGAGGAGGAGAGATGTGAACTT AGT ACC TGA GTA CCC AGA AGA CCC AGA TAA CGC ACA TAC CAG GGA AC AG TTTGTCTCACGGTGGATGG –3'
S132E-C47	5' – GGGAGGAGGAGAGATGTGAACTT GTC GCC CAA AAC ACC ACG ATA AAG TTA ACC GGC AAA GAC ACG TCG CG AG TTTGTCTCACGGTGGATGG –3'

#### 2.4.4 Modifizierte Aptamere

Die durch Biotinylierung (am 5'- oder 3'-Ende) oder Cy5-Markierung (am 5'-Ende) modifizierten Aptamere wurden von der Firma Metabion, Martinsried/D, bzw. der Firma BioSpring GmbH, Frankfurt a. M./D synthetisiert und als Stammlösungen in einer Konzentration von 100 pmol/µl geliefert.

## 2.5 Längenstandards

Für die Agarosegelelektrophorese wurde als DNS-Standard die GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder und als RNS-Standard die RiboRuler™ Low Range RNA Ladder von der Firma Fermentas, St. Leon-Rot/D verwendet.

## 2.6 Enzyme und Chemikalien

Produkt	Hersteller
6-Aminohexansäure	Sigma-Aldrich, München/D
Agarose, LE	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf/D
Ammoniumazetat	Fluka BioChemika, Buchs/CH
Ammoniumpersulfat ultrapure (APS)	National Diagnostics, Atlanta, GA/USA
Adenosin 5'-Triphosphat ATP (100 mM)	Larova GmbH, Teltow/D
Biocoll Separating Solution (Ficoll)	Biochrom AG, Berlin/D
Biotin (≥ 99 %)	Sigma-Aldrich, München/D
Borsäure	SERVA Electrophoresis, Heidelberg/D
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München/D
BSA (Bovine Serum Albumin)	PAA Laboratories, Pasching/A
Calciumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/D
CD40 (human):FC (human) (recombinant)	ENZO Life Sciences, Lörrach/D
CD40 Ligand human	Sigma-Aldrich, München/D
Chloroform	Sigma-Aldrich, München/D
Dithiothreitol (DTT)	Epicentre® Biotechnologies, Madison, WI/USA
DNase I recombinant, RNase-free	Roche Applied Science, Mannheim/D
DNS-Auftragspuffer (6 x)	Fermentas, St. Leon-Rot/D
EDTA (Ethyldiamintetraacetat) Dinatriumsaltz Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/D
Eindeckmedium Immunoselect Antifading Mounting	DIANOVA GmbH, Hamburg/D
Ethanol 99,5 % reinst	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/D
Ethidiumbromid	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe/D
FACS™ Flow, Clean und Rinse	BD Biosciences, Heidelberg/D
Fötales Rinderserum, Sera Plus (FBS)	PAN™ Biotech, Aldenbach/D
Glycogen	Roche Applied Science, Mannheim/D
Guanosin 5'-Trophosphat GTP (100 mM)	Larova GmbH, Teltow/D
H <sub>2</sub> O bidestilliert	AppliChem GmbH, Darmstadt/D
H <sub>2</sub> O (RNase und DNase frei)	Fluka BioChemika, Buchs/CH
HCl (Salzsäure) 1 N	Sigma-Aldrich, München/D

Heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa, low molecular weight (3 kDa), < 60 U/mg	Sigma-Aldrich, München/D
Heparin-Natrium Braun 25 000 I.E./5 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen/D
Humanserum (HS), Typ AB, 0,2 µm steril filtriert	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach/D
Interleukin-4 (IL-4)	Sigma-Aldrich, München/D
Ionomyzin	Sigma-Aldrich, München/D
Kaliumhydroxidplättchen 85 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/D
L-Glutamin	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe/D
Lysozym (aus Hühnereiweiß, ≈ 7000 U/mg)	Sigma-Aldrich, München/D
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Sigma-Aldrich, München/D
<i>MegaCD40L</i> ™, Soluble (human) (recomb.)	ENZO Life Sciences, Lörrach/D
Methanol	Applied Biosystems, Foster City, CA/USA
Mouse Anti-Human CD28, purified NA/LE	BD Biosciences, Heidelberg/D
Natriumazetat, wasserfrei	Sigma-Aldrich, München/D
Natriumchlorid 99 % reinst	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/D
Natriumhydroxid-Lösung (für HPLC)	Fluka BioChemika, Buchs/CH
Natriumphosphat (dibasisch)	Sigma-Aldrich, München/D
PBS (1 x), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe/D
PBS Puffer 10 x, pH 7,4	Ambion®/Invitrogen™, Karlsruhe/D
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe/D
PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat)	Sigma-Aldrich, München/D
Pyrophosphatase, anorganisch (PPase)	Roche Applied Science, Mannheim/D
Recombinant human soluble CD40-Ligand	PeproTech, Hamburg/D
Recombinant murin soluble CD40L-Ligand	PeproTech, Hamburg/D
Ribonukleotide (ATP, UTP, CTP, GTP)	LAROVA, Teltow/D
Roti®-Phenol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/D
Rotiphorese Sequenziergel Konzentrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/D
Rnasin® Ribonuklease Inhibitor, recomb., 20-40 U/µl	Promega, Madison, WI/USA
RNS-Auftragspuffer (2 x)	Fermentas, St. Leon-Rot/D
RPMI 1640 (ohne L-Glutamin)	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe/D
Sec7 (Domäne aus Cytohesin 1, rekombinant, 24,3 kDa) (kostenlos zur Verfügung gestellt)	NascaCell Technologies AG, München/D

Streptavidin	Roche Applied Science, Mannheim/D
Streptavidin-PE	Invitrogen™, Karlsruhe/D
T4-PNK (Polynukleotidkinase)	New England Biolabs, Ipswich, MA/USA
T7 RNS Polymerase (50 U/μl)	Stratagene/Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA/USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED) Electran®	VWR International GmbH, Darmstadt/D
TRIS-Hydrochlorid Pufferan (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/D
TRIS Ultra Qualität Pufferan 99,9 % (Tris Base)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/D
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich, München/D
Tween® 20	Sigma-Aldrich, München/D
Urea 98+ % (Harnstoff)	Sigma-Aldrich, München/D
Xylen Cyanol	Merck KGaA, Darmstadt/D

## 2.7 Kommerzielle Analysesysteme (Kits)

Bezeichnung	Hersteller
Anti-Biotin-MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
Anti-PE-MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
BD Calibrite APC Beads	BD Biosciences, Heidelberg/D
B cell Isolation Kit II, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
CD4 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
CD40L, Soluble (human) (recombinant), Set mit Enhancer für Liganden	ENZO Life Sciences, Lörrach/D
Dynabeads® CD3/CD28 T cell expander	Invitrogen™, Karlsruhe/D
Dynabeads® M450-Epoxy	Invitrogen™, Karlsruhe/D
Dynabeads® M280-Streptavidin	Invitrogen™, Karlsruhe/D
Pan T cell Isolation Kit II, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
Qiagen One Step RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden/D
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden/D
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden/D

Taq PCR Core Kit	Qiagen, Hilden/D
T-Cell Activation 96-well Assay Plates, Anti-Human CD3 Uncoated Control	BD Biosciences, Heidelberg/D

## 2.8 Puffer und Lösungen

Anwendungsgebiet und Pufferbezeichnung	Zusammensetzung
Durchflusszytometrie:	
Inkubationspuffer (Aptamere)	PBS, 3 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 U/ml Heparin-Natrium, 1 µg/µl BSA
Waschpuffer (Aptamere)	PBS, 3 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 U/ml Heparin-Natrium
Dynabeads® M280-Streptavidin, Invitrogen™:	
B+W-Puffer (5 x)	25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2,5 mM EDTA, 5 M NaCl
Dynabeads® M450-Epoxy, Invitrogen™:	
Waschpuffer	PBS, 3 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 µg/µl BSA
Filterbindungsanalyse:	
Kathodenpuffer	40 mM 6-Aminohexansäure, 20 % (v/v) Methanol
Selektionspuffer	PBS, 3 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 µg/µl Heparin, 1 µg/µl BSA
Waschpuffer (DNS-Aptamere)	PBS, 3 mM MgCl <sub>2</sub>
Waschpuffer (RNS-Aptamere)	PBS, 3 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,05% Tween® 20
Gelelektrophorese-Laufpuffer:	
TBE-Puffer (10 x)	890 mM Tris Base, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA pH 8,0
MACS-Puffer	PBS, 0,5 % BSA
Polyacrylamid-Gel:	
Denaturierender Ladepuffer	9 M Harnstoff (Urea), 50 mM EDTA pH 8,0
Größenstandard	Denat. Ladepuffer + Spatelspitze Bromphenolblau + Spatelspitze Xylen Cyanol
Lösung B	10 x TBE, 8,3 M Harnstoff (Urea)
Lösung C	Rotiphorese Sequenziergel Konzentrat (Carl Roth GmbH + Co. KG)



Lösung D	8,3 M Harnstoff (Urea)		
TK-Puffer (5 x)	200 mM Tris-HCl pH 7,9		
Zellkulturmedien:			
RPMI 1640-Medium für frisch isolierte Zellen	RPMI-1640	1 % HS (hitzeinaktiviert 30 min, 56 °C, sterilfiltriert) 1 % L-Glutamin (final 2 mM) 1 % Pen/Strep (final 100 U/ml Pen, 100 µg/ml Strep)	
RPMI 1640-Medium für Zellkultur (Zelllinien)	RPMI-1640	10 % FBS (hitzeinaktiviert 30 min, 56 °C, sterilfiltriert) 2 % L-Glutamin (final 4 mM) 1 % Pen/Strep (final 100 U/ml Pen, 100 µg/ml Strep)	

## 2.9 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Assayplatten, flexibel, 96-Loch, Rundboden	BD Falcon™, Heidelberg/D
Blotting Papier, GB003	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Whatman Group, Dassel/D
Cell Strainer 40 µm Nylon	BD Falcon™, Heidelberg/D
Einmalinjektionskanülen	Henry Schein, Inc. Melville, NY/USA
Einmalpipetten (Costar® Stripette®) (2, 5, 10 und 25 ml)	Costar, Corning Inc., Corning NY/USA
FACS-Röhrchen:	
5 ml	BD Falcon™, Heidelberg/D
Propylene Tubes (PPN-tube-96)	Micronic bv, Lelystad/NL
Frischhalte-Folie	
Toppits®, selbsthaftend	Melitta Haushaltsprodukte, Minden/D
SARAN	Dow Chemical Company, Midland, MI/USA
Glaswolle	SERVA Electrophoresis, Heidelberg/D
Küchentücher Clou Smart	WEPA Professional GmbH, Ansberg/D
MACS-Säulen (MS, LS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
Millex® GP Filter Unit, Porengröße 0,22 µm	Millipore GmbH, Schwalbach/D

Nitrozellulose Transfer Membran, PROTRAN® BA 85	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Whatman Group, Dassel/D
Objektträger (76 x 26 mm) und Deckgläser (24 x 40 mm)	Gerhard Menzel GmbH/Thermo Fischer Scientific, Braunschweig/D
Parafilm® M Verschlussfolie	American National Can™, Chicago, LI/USA
Perfusionsbesteck, Ecoflo®-Safety	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen/D
pH-Fix Indikatorstäbchen	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren/D
Pipettenspitzen:	
Universalspitzen 0,5 - 10 µl, 1 - 200 µl, 100 - 1000 µl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/D
Oberflächenoptimierte Filterspitzen	nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe/D
Reaktionsgefäße:	
0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg/D
1,6 ml, amber	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf/D
15 ml, 50 ml	BD Falcon™, Heidelberg/D
Skalpelle, chirurgische Einmalskalpelle	B. Braun/Aesculap, Tuttlingen/D
Spritzen	
Orginal-Perfusor® (20 ml, 50 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen/D
2 ml, 5 ml	Terumo Deutschland GmbH, Eschborn/D
Steritop® und Stericup®, Porengröße 0,22 µm GP Express PLUS Membran	Millipore GmbH, Schwalbach/D
Ultrafree®-MC, Centrifugal Filter Units, HV, 0,45 µm	Millipore GmbH, Schwalbach/D
Untersuchungshandschuhe:	
Peha-soft® satin (Powderfree)	PAUL HARTMANN AG, Heidenheim/D
Flexam® Nitrile	Cardinal Health, Dublin, OH/USA
Wischtücher Scott®	Kimberly-Clark GmbH, Koblenz/D
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	TPP®, Trasadingen/CH
Zellkultur-Testplatten: 6-, 24-, 96-Loch	TPP®, Trasadingen/CH

## 2.10 Technische Geräte / Laborausstattung

Gerät	Hersteller
BAS-III S 2040 Imaging Plate (20 x 40 cm)	Fuji Photo Film Co. LTD, Tokyo/Japan
Belichtungskassette GEVAMATIC (20 x 40 cm)	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel/B
Durchflusszytometer BD FACSCalibur™	BD Biosciences, Heidelberg/D
DynaMag™ CTS™ (Magnetständer)	Invitrogen™, Karlsruhe/D
Elektrophorese-Kammer Horizontal: Bioplex Vertikal: Doppel-Elektrophorese 80 EL	Strehlau & Kruse GmbH ; Freiburg/D Labor-Brand, Gießen/D
Flockeneisbereiter AF-200	Scotsman® Ice Systems, Mailand/I
Fluoreszenzmikroskop BX51	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg/D
Fuji Phosphorimager FLA-5100	Fuji Photo Film Co. LTD, Tokyo/J
Gefrierschränke: -20 °C -80 °C (HFU686 Plus)	LIEBHERR und PRIVILEG/D Heraeus Instruments, Osterode/D
Geldokumentationssystem InGenius	Syngene, Cambridge/UK
Gelplatten (für PAGE)	G&P Kunststofftechnik GbR, Kassel/D
Heizplatte/Magnetrührer IKAMAG® RET	IKA®-Werke GmbH + Co. KG, Staufen/D
Kieselgel-Platten (hochrein, mit Fluoreszenzindikator)	Sigma-Aldrich, München/D
Kühlschrank (4 °C)	PRIVILEG/D
MACS® MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
µMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
Mastercycler® Gradient	Eppendorf, Hamburg/D
Mikrowelle	SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern/D
Mikroskop Telaval 31	Carl Zeiss, Jena/D
Milli-Q Academic System (Reinstwasserherstellung)	Millipore GmbH, Schwalbach/D
Minifold I Dot-Blot System – 96 Well	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Whatman Group, Dassel/D
Monolith NT.115	NanoTemper Technologies GmbH, München/D
NanoDrop NP-1000 Spectrophotometer	Thermo Fischer Scientific, Wilmington MA/USA

Netzgerät für Gelelektrophorese	Gibco BRL® live Technologies, Eggenstein/D
pH-Meter Toledo 320	Mettler-Toledo GmbH, Giessen/D
Pipetten	Gilson Inc., Middleton, WI/USA Eppendorf, Hamburg/D
Pipettiergeräte:	
Accu Jet Pro	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim/D
Pipetboy comfort und Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences, Fernwald/D
Rollen-Mischgerät RM 5	Karl Hecht GmbH + Co. KG „Assistent“ Sondheim/Rhön/D
Sterilbank HERASafe	Heraeus Instruments, Osterode/D
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg/D
UV-Handlampe (Ultraviolettstrahler)	Konrad Benda Laborgeräte, Wiesloch/D
Vakuumpumpen:	
Typ MZ 2 C (für FBA)	Vacuubrand GmbH + Co. Wertheim/D
Laborpumpe (für Sterilfiltration)	KNF Neuberger GmbH, Freiburg/D
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein, Zürich/CH
Waage PC 200	Mettler-Toledo GmbH, Giessen/D
Wasserbad	GFL – Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel/D
Zählkammer, Neubauer improved	Labor Optik, Freidrichsdorf/D
Zellinkubator Modelle HERACell und BB5060	Heraeus Instruments, Osterode/D
Zentrifugen:	
Quick Spin Minizentrifuge Sprout	Vernon Hills, IL/USA
Kleinzentrifugen EBA 12 R und Mikro 200	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen/D
Megafuge 1.0	Heraeus Instruments, Osterode/D

## 2.11 Computerprogramme

Im Rahmen der Dissertation wurde mit folgenden Programmen gearbeitet:

Programm	Hersteller
AIDA Image Analyzer	raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt/D
BD CellQuest Pro <sup>TM</sup>	BD Biosciences, Heidelberg/D
GeneSnap	Syngene, Cambridge/UK
Kaleidagraph 4.0	Synergy Software, Reading, PA/USA
MDS (Micrometastasis Detection System)	Applied Imaging Corp., San Jose, CA/USA
Mfold (Zuker, 2003)	<a href="http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold">http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold</a>
Microsoft Office 2003	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim/D
NanoDrop 1000 Version 3.2.0	Thermo Fischer Scientific, Wilmington, MA/USA

## 2.12 Personen

Folgenden Personen wird für die Bereitstellung von Materialien oder die Hilfe bei der Einarbeitung in verschiedene Methoden gedankt:

**Baaske, P.** NanoTemper Technologies GmbH, München/D (Thermophorese)

**Kremmer, E.** IMI, Helmholtz Zentrum München/D (anti-CD40L-Antikörper, Klon 2B7)

**Laux, G.** OE, Helmholtz Zentrum München/D (Radioaktives Arbeiten)

**Schoberth, A.** TRION Research GmbH, Martinsried/D (Fluoreszenzmikroskopie)

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Arbeiten

#### 3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mithilfe einer hitzestabilen DNS-Polymerase (Taq-DNS-Polymerase) werden in dem zyklischen Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“, PCR) definierte DNS-Abschnitte (Matrizen) in jedem Zyklus verdoppelt. Als Startermoleküle für die DNS-Synthese dienen Oligonukleotide (= „Primer“), die zu bestimmten Sequenzabschnitten komplementär sind und die Zielsequenz flankieren. Die verschiedenen Phasen der PCR (Denaturierung der DNS in Einzelstränge bei 94 °C, Hybridisierung der Oligonukleotide an die DNS und Elongation der Primer am 3'-Ende durch die DNS-Polymerase bei 71 - 75 °C) wiederholen sich in einer bestimmten Anzahl von Zyklen, wodurch der zwischen den Oligonukleotiden liegende Sequenzbereich exponentiell vervielfältigt wird.

##### 3.1.1.1 Präparative PCR

Die präparative PCR der DNS-Matrizen für die Transkription in RNS-Aptamere wurde mithilfe des Taq PCR Core Kits von Qiagen (Hilden/D) durchgeführt. Dieses Set enthält mit der Taq-DNS-Polymerase, einer dNTP-Mischung, reinem Wasser und dem PCR-Puffer (in 10-fach optimiertem Reaktionskonzentrat) samt  $\text{MgCl}_2$ , alle Bestandteile, die für eine PCR benötigt werden, außer den spezifischen Primern und der DNS-Vorlage, die amplifiziert werden soll. Der Reaktionsansatz umfasste in der Regel 100 µl und setzte sich wie folgt zusammen:

10 x PCR-Puffer	10 µl
dNTP-Mischung (je 10 mM)	2 µl
3'-Primer (100 µM)	1 µl
5'-Primer (100 µM)	1 µl
Matrize (1 µM)	1 µl
Taq	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 100 µl

Als Negativkontrolle wurden entsprechende Ansätze ohne Matrize mitgeführt.

Die PCR lief nach folgendem Programm im Mastercycler® Gradient (Eppendorf, Hamburg/D) ab:

Denaturierung	94 °C, 1 min	} 15 x
Annealing	55 bzw. 60 °C, 1 min	
Elongation	71 °C, 1 min	
Herunterkühlen auf	4 °C, ∞	

Die Annealing-Temperatur für Klone aus der DNS-Bibliothek D40 betrug 55 °C, die Temperatur für DNS-Matrizen für RNS-Aptamere der N47Ny-Bibliothek 60 °C. Die Kontrolle der PCR erfolgte durch die Analyse von 5 µl PCR-Reaktion auf einem 2,5 % Agarosegel (siehe 3.1.3.1). Die Negativkontrolle sollte dabei keine Bande zeigen. Wenn Banden zu schwach erschienen, erfolgten zusätzliche PCR-Zyklen nach oben beschriebenem Ablauf. Dafür wurden nochmals 0,5 µl Taq-Polymerase in den PCR-Ansatz zugegeben.

### 3.1.1.2 Markierungs-PCR („Tagging-PCR“)

Die Markierungs-PCR („Tagging-PCR“) beschreibt eine PCR, in der anhand von markierten Primern das PCR-Produkt gekennzeichnet wird. Dabei gibt es vielfältige Markierungsmöglichkeiten für die unterschiedlichsten Anwendungsbereiche.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode der Tagging-PCR zur Herstellung von einzelsträngigen DNS-Aptameren (auch die stufenweise verkürzten Sequenzen) durchgeführt. Dafür wurde ein 5'-biotinylierter 3'-Primer (Metabion, Martinsried/D) in einer präparativen PCR (siehe 3.1.1.1) eingesetzt. Die Einzelstrangtrennung des doppelsträngigen PCR-Produkts erfolgte wie unter 3.1.4 beschrieben.

## 3.1.2 In vitro Transkription

Die Herstellung von 2'-Fluoro-RNS-Aptameren erfolgte über eine in vitro Transkription (TK) einer doppelsträngigen DNS-Matrize (PCR-Produkt) mithilfe der T7-RNS-Polymerase aus dem Bakteriophagen T7 (Cazenave & Uhlenbeck, 1994). Die

vorangehende PCR (siehe 3.1.1) muss dabei ein Primer den T7-Promotor enthalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einem Primersystem gearbeitet, dessen 5'-Primer die Promotorsequenz (fett gedruckt) enthielt. Vor dem Promotor müssen noch mindestens fünf Basenpaare liegen, damit die Polymerase anlagern kann. Außerdem bevorzugt die T7-RNS-Polymerase als erste Nukleotide nach dem Promotor GG, wie auch im verwendeten Primer vorhanden. Der Primer-Bereich der Aptamersequenz ist unterstrichen abgebildet.

5'P-1.45: 5' - AAT TCT **AAT ACG ACT CAC TAT AGG** GAG GAG GAG AGA  
TGT GAA CTT -3'

Die Transkription wurde typischerweise wie folgt in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg/D) angesetzt und für 4 h bei 37 °C (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg/D) inkubiert:

#### 5 x TK-Puffer

(200 mM Tris-HCl pH 7,9)	20 µl	
ATP (100 mM)	1 µl	(Larova GmbH, Teltow/D)
GTP (100 mM)	1 µl	(Larova GmbH, Teltow/D)
2'-F-dCTP (100 mM)	3 µl	(Epicentre® Biotechnologies, Madison, WI/USA)
2'-F-dUTP (100 mM)	3 µl	(Epicentre® Biotechnologies, Madison, WI/USA)
MgCl <sub>2</sub> (1000 mM)	1,5 µl	
DTT (0,1 M)	5 µl	(Epicentre® Biotechnologies, Madison, WI/USA)
T7-Polymerase/Rnasin (50 U/µl)	2 µl	(Stratagene/Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA/USA)
Rnasin (20-40 U/µl)	1 µl	(Promega, Madison, WI/USA)
dsDNS-Matrize (PCR-Produkt)	10 µl	
H <sub>2</sub> O	ad 100 µl	

Für die Herstellung größerer Mengen an stabilisierten RNS-Aptameren wurde zusätzlich anorganische Pyrophosphatase in einer finalen Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt (Roche Applied Science, Mannheim/D). Diese wandelt in der Transkriptions-Reaktion entstehendes Pyrophosphat in Orthophosphat um, verhindert somit die



inhibierende Wirkung von Pyrophosphat und verstärkt die Ausbeute. Außerdem wurde in diesem Fall die doppelte Menge an T7-Polymerase und 200 pmol dsDNS-Matrize eingesetzt und die TK über Nacht inkubiert, ebenfalls um die Ausbeute zu verbessern.

Nach der Inkubation wurden die TK-Ansätze kurz abzentrifugiert, 0,5 µl Dnase I (= 5 Units; Roche Applied Science, Mannheim/D) zugegeben, durch Schnippen gemischt und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. In diesem Schritt wird die DNS-Matrize abgebaut. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 50 µl H<sub>2</sub>O und 0,5 M EDTA (pH 8,0), um die Dnase zu inaktivieren und entstandenes Pyrophosphat zu lösen. Vor und nach Dnase-Verdau wurden je 5 µl des TK-Ansatzes entnommen und in einer Agarosegelelektrophorese der Erfolg der *in vitro* Transkription getestet. Je nach weiterer Verwendung der hergestellten 2'-Fluoro-RNS-Aptamere folgten unterschiedliche Aufreinigungsschritte.

### **3.1.3 Gelelektrophorese**

Die analytische Methode der Gelelektrophorese dient dazu, verschiedene Moleküle nach Größe und Ladung in einem elektrischen Feld aufzutrennen. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Arten der Gelelektrophorese durchgeführt.

#### **3.1.3.1 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren**

DNS- oder RNS-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Es wurde eine Konzentration der Agarose von 2,5 % gewählt (hier erwartete Fragmentgröße betrug ca. 80 - 100 bp, bzw. 80 - 100 b). Nach Aufschmelzen der Agarose (Agarose LE, Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf/D) in 1 x TBE-Puffer (siehe 2.8) folgte die Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration 1 µg/ml, 3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylanthridiniumbromid, 10 mg/ml Ausgangslösung der Firma Gibco BRL®). Damit die Nukleinsäure-Proben in die Taschen absinken können, wurden sie vor dem Auftragen mit einem Auftragspuffer versetzt. Im Fall von DNS wurden 5 µl Probe mit 2,5 µl DNS-Auftragspuffer (Fermentas, St. Leon-Rot/D) vermischt und davon 5 µl auf das Gel aufgetragen; im Fall von RNS wurde 2,5 µl Probe mit 2,5 µl H<sub>2</sub>O und 5 µl RNS-Auftragspuffer (Fermentas, St. Leon-Rot/D) durchmischt, für 10 min bei 70 °C im Heizblock (Thermomixer, Eppendorf, Hamburg/D) inkubiert, auf Eis abgekühlt und davon 8 µl auf das Gel aufgetragen. Für die Größenbestimmung der im Gel auf-

getrennten Fragmente wurde ein Molekularbasen(paar)marker (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder für DNS, RiboRuler™ Low Range RNA Ladder für RNS, Fermentas, St. Leon-Rot/D) mit definierten DNS- bzw. RNS-Fragmenten bekannter Größe aufgetragen. Vom DNS-Marker wurden 4 µl verwendet, vom RNS-Marker wurden 2 µl mit dem RNS-Auftragspuffer (Fermentas, St. Leon-Rot/D) durchmischt, in Analogie zu den RNS-Proben für 10 min bei 70 °C im Heizblock (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg/D) inkubiert, auf Eis abgekühlt und alle 4 µl auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte für 20 - 30 min bei 180 - 200 V. Anschließend wurde die Gele in einem Geldokumentationssystem (InGenius, Syngene, Cambridge/UK) mit UV-Licht einer Wellenlänge von 312 nm beleuchtet, was dem Anregungsspektrum des Ethidiumbromids entspricht, und fotografiert.

### **3.1.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Aufreinigung von RNS-Aptameren (PAGE)**

Zur präparativen Aufreinigung größerer Mengen transkribierter RNS-Aptamere (siehe 3.1.2) erfolgte eine denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Dafür wurden 8 %-ige Gele mit einer Gelstärke von 1 mm und einer Trennstrecke von 15 - 18 cm hergestellt. 5 ml des denaturierenden PAGE-Gelpuffers (Lösung B, siehe 2.8) wurden hierzu mit 16 ml Rotiphaere Sequenziergel Konzentrat (Lösung C, siehe 2.8) und 29 ml der 8,3 M Harnstofflösung (Lösung D, siehe 2.8) vermischt. Durch die Zugabe von 400 µl 10 % APS-Lösung und 20 µl TEMED (VWR International GmbH, Darmstadt/D) startete die radikalische Polymerisation. Die Lösung wurde sofort zwischen die Gelplatten (G&P Kunststofftechnik GbR, Kassel/D) gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Nach einer Polymerisation von 45 min bei RT wurde der Probenkamm entfernt und das Gel in eine vertikale Gelapparatur (Labor-Brand, Gießen/D) eingesetzt. Nachdem die Kammer mit Laufpuffer (1 x TBE, siehe 2.8) befüllt und die Probenaschen mit Laufpuffer gespült worden waren, erfolgte ein 60-minütiger Vorlauf bei 300 V zur Equilibrierung der Ladungsträger. Anschließend wurden die Probenaschen nochmals gründlich mit Laufpuffer gespült. Die mit Ammoniumazetat gefällten RNS-Proben (siehe 3.1.5.3) wurden in denaturierendem PAGE-Ladepuffer (siehe 2.8) aufgenommen (40 µl pro Tasche), für 3 min bei 95 °C denaturiert, und, nachdem sie auf RT abgekühlt waren, auf das Gel aufgetragen. Als grober Längenmarker wurde ein mit etwas Bromphenolblau und Xylencyanol versetzter PAGE-Ladepuffer (Größenstandard, siehe 2.8) verwendet. Die beiden Farbstoffe zeigen bei einer definierten Gelkonzentration ein konstantes Laufverhalten. Zur

Trennung wurde für die ersten 30 min eine Spannung von 300 V angelegt, anschließend folgte die Erhöhung der Spannung auf 350-400 V. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Geltemperatur 45 °C nicht überschreitet. Das Gel wurde abgestoppt, sobald die Bromphenolblau-Bande aus dem Gel gelaufen war.

Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel von den Trennscheiben abgelöst und in Frischhaltefolie (Topits®, Melitta Haushaltsprodukte, Minden/D) eingeschlagen. Die RNS wurde mithilfe einer Kieselgelplatte (Sigma-Aldrich, München/D) und einem UV-Licht der Wellenlänge 254 nm (UV-Handlampe, Konrad Denda Laborgeräte, Wiesloch/D) visualisiert, die entsprechenden Banden markiert, mit einem sterilen Skalpell (B. Braun/Aesculap, Tuttlingen/D) ausgeschnitten und ohne die Folie in ein 2 ml Reaktionsgefäß der Firma Eppendorf (Hamburg/D) überführt. Dort wurde das Gelstück mithilfe einer Pipettenspitze zerkleinert, zur passiven Elution mit 500 µl 0,3 M Natriumazetatlösung (pH 5,2) versetzt und durch Vortexen vermischt. Die Elution erfolgte im Schüttler (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg/D) bei 1150 rpm und RT über Nacht. Anschließend wurde der Gelbrei durch eine mit Glaswolle (SERVA Electrophoresis, Heidelberg/D) gestopfte Spritze (Terumo Deutschland GmbH, Eschborn/D) in neue 2 ml Reaktionsgefäße filtriert, um größere Gelstücke zu entfernen. Um auch kleinere Gelreste zu beseitigen, wurde die Lösung zusätzlich über Ultrafree®-MC-Zentrifugensäulen (Centrifugal Filter Units, HV, 0,45 µm, Millipore GmbH, Schwalbach/D) bei 12000 rpm für 3 min zentrifugiert (Kleinzentrifuge EBA 12 R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen/D). Der Durchfluss wurde in neue 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, mit 3 Volumen absolutem Ethanol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/D) vermischt und, wie unter 3.1.5.3 beschrieben, gefällt und in H<sub>2</sub>O gelöst.

### **3.1.4 Einzelstrang-Trennung doppelsträngiger DNS**

Zur enzymatischen Herstellung von DNS-Aptamerklonen musste nach einer Markierungs-PCR mit einem biotinylierten Primer (siehe 3.1.1.2) das doppelsträngige PCR-Produkt getrennt werden, sodass der Aptamerstrang ohne seinen komplementären Gegenstrang vorliegt. In diesem Fall war der Primer für den Gegenstrang biotinyliert, der Primer für den Aptamerstrang unmarkiert. Das doppelsträngige PCR-Produkt wurde über seine Biotin-Markierung an Streptavidin-Kügelchen (Dynabeads® M280-Streptavidin, Invitrogen™, Karlsruhe/D) gebunden, der

nicht biotinylierte Aptamerstrang von seinem Gegenstrang durch die Zugabe einer stark alkalischen Lösung (hier 0,1 M NaOH) getrennt und anschließend gefällt.

Die Streptavidin-Kügelchen wurden dafür wie im Folgenden beschrieben vorbereitet (Rechnungsbeispiel für fünf Markierungs-PCR-Ansätze):

- 65 µl SA-Beads (10 mg/ml) 2 x waschen mit je 500 µl 2 x B+W Puffer (mithilfe des Magnetständers DynaMag™ CTS™, Invitrogen™, Karlsruhe/D)
- Resuspendieren der Beads in 125 µl 5 x B+W-Puffer
- jeweils 25 µl Beads in 5 x B+W-Puffer in beschrifteten 2 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg/D) vorlegen

Die vorbereiteten Streptavidin-Kügelchen wurden mit dem Markierungs-PCR-Ansatz (nach Agarosegelanalyse, 95 µl) versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden dabei regelmäßig durch Schnippen gemischt.

Jeder Ansatz wurde wie folgt weiter bearbeitet:

- 2 x waschen mit 500 µl 2 x B+W-Puffer
- 1 x waschen mit 100 µl H<sub>2</sub>O
- 4 min Inkubation mit 22 µl 0,1 M NaOH zur Trennung der Doppelstränge (anschließend in den Magnetständer DynaMag™ CTS™ stellen)
- 20 µl davon in neues 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg/D) überführen (enthält den Aptamerstrang, biotinylierter Gegenstrang bleibt an SA-Beads gebunden)
- Nachwaschen der Beads mit 20 µl 0,1 M NaOH
- 20 µl der Waschfraktion mit vorheriger NaOH-Fraktion vereinigen
- Zugabe von insgesamt 20 µl 0,2 M HCl und H<sub>2</sub>O zur Neutralisierung (vorher mit pH-Stäbchen testen, in welchem Verhältnis 0,2 M HCl und H<sub>2</sub>O vermischt werden müssen, um mit 20 µl des Gemisches 40 µl 0,1 M NaOH zu neutralisieren)
- Gesamt-Volumen: 60 µl

Anschließend erfolgte die Fällung des einzelsträngigen DNS-Aptamerklons mit Natriumazetat (siehe 3.1.5.3).

### **3.1.5 Aufarbeitung und Aufreinigung von Nukleinsäuren**

Zur Aufreinigung von Nukleinsäuren wurden in dieser Arbeit je nach Anforderung im Bezug auf eingesetzte Nukleinsäure-Menge, Ausbeute und Qualität verschiedene Methoden angewendet.

#### **3.1.5.1 Silikat-Membran-basierte Aufreinigung von Nukleinsäuren**

Eine sehr schnelle und einfache Methode der Aufreinigung von PCR- oder Transkriptions-Produkten (DNS und RNS) bieten die kommerziellen Systeme von Qiagen (Hilden/D). Der QIAQuick Nucleotide Removal Kit und auch der QIAQuick PCR Purification Kit enthalten mit Spin-Säulen, Puffern und Sammelröhrchen alle wichtigen Bestandteile für eine Silikat-Membran-basierte Aufreinigung von Oligonukleotiden bzw. PCR-Produkten. Der QIAQuick Nucleotide Removal Kit ist optimal für Aufreinigung von Oligonukleotiden (> 17 Nukleotide) und dsDNS (40 bp bis 10 kb), während der QIAQuick PCR Purification Kit für die Aufreinigung von PCR-Produkten (100 bp bis 10 kb) die bestmöglichen Bedingungen liefert. Das Prinzip dieser Aufreinigungsart basiert auf der Tatsache, dass Silikate in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen spezifisch Nukleinsäuren binden, während freie Nukleotide, Enzyme, Salze und andere verunreinigende Substanzen entfernt werden. Die gebundenen Nukleinsäuren lassen sich nach dem Waschen schließlich mit H<sub>2</sub>O oder einem Puffer mit niedriger Salzkonzentration von der Membran eluieren. Die so präparierten Proben sind ohne weitere Aufreinigungsschritte direkt in unterschiedlichen Anwendungen (z. B. in Filterbindungsanalysen) einsetzbar.

Die Durchführung der Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben, allerdings wurde nach jedem Waschschrift ein neues Sammelröhrchen verwendet. Die Zentrifugationschritte erfolgten in der Kleinzentrifuge EBA 12 R, bzw. im Fall von radioaktiv markierten Aptameren (siehe 3.1.7) in der Kleinzentrifuge Mikro 200 (beide Hettich Zentrifugen, Tuttlingen/D).

### 3.1.5.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Eine klassische Methode zur Aufreinigung von Nukleinsäuren ist die Phenol-Chloroform-Extraktion (Chomczynski & Sacchi, 1987), bei der die unterschiedlichen Löslichkeiten von Nukleinsäuren und Proteinen in einer zweiphasigen Emulsion genutzt werden. Im Rahmen der Arbeit wurde diese Aufreinigungsmethode für PCR-Produkte verwendet, die darauffolgend als Matrize für eine Produktion von 2'-Fluorostabilsierter RNS mittels in vitro Transkriptionen dienten, wie zum Beispiel nach der Großformat-PCR.

Die Aufreinigung wurde nach folgendem Ablauf durchgeführt (alle Zentrifugationschritte erfolgten in der Kleincentrifuge EBA 12 R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen/D, die 2 ml Reaktionsgefäße waren von Eppendorf, Hamburg/D):

- PCR-Produkt mit einem Volumen Roti<sup>®</sup>-Phenol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/D) in ein 2 ml Reaktionsgefäß vereint (10 s vortexen)
- Zentrifugation 3 min, 13000 rpm, 4 °C
- Überführen der oberen wässrigen Phase in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß
- Zugabe von einem Volumen Roti<sup>®</sup>-Phenol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/D) (10 s vortexen)
- Zentrifugation 3 min, 13000 rpm, 4 °C
- Überführen der oberen wässrigen Phase in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß
- Zugabe von zwei Volumen Chloroform (Sigma-Aldrich, München/D) (10 s vortexen)
- Zentrifugation 3 min, 13000 rpm, 4 °C
- Überführen der oberen wässrigen Phase in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß

Um Phenolreste aus der Lösung zu entfernen und die DNS zu konzentrieren, wurde eine Ethanol-Fällung durchgeführt (siehe 3.1.5.3).

### 3.1.5.3 Ethanol-Fällung von Nukleinsäuren

Die Ethanol-Fällung ist nicht nur zum Konzentrieren, sondern auch zum Reinigen von Nukleinsäuren gut geeignet, da viele Substanzen in Gegenwart von Alkohol deutlich schlechter präzipitieren als DNS.

Dafür wurden zu der Nukleinsäurelösung 0,1 Volumen 3 M Natriumazetat (pH 5,2) und anschließend 3 Volumen absoluter Ethanol gegeben. Der Ansatz wurde gemischt und in Abhängigkeit des Fällungsvolumens für 15 bis 30 min bei -80 °C inkubiert (bis die Lösung viskos wurde). Nach einer Zentrifugation von 20 min bei 13000 rpm bei 4 °C wurde der Überstand abgenommen und das Sediment mit 70 % Ethanol gewaschen (Zentrifugation 10 min, 13000 rpm, 4 °C). Nachdem der Überstand vorsichtig abgenommen und das gewaschene Sediment getrocknet war, wurde es in H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Alle Zentrifugationsschritte wurden in der Kleincentrifuge EBA 12 R durchgeführt (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen/D).

Ein alternativer Fällungsansatz erfolgte mit Ammoniumazetat. Dafür wurden im ersten Schritt 0,5 Volumen 6 M Ammoniumazetat (pH 7,0) zu der Nukleinsäure-Lösung gegeben. Die Fällung fand durch 15 - 30 min Inkubation bei RT statt. Die weiteren Schritte entsprachen denen der Alkohol-Fällung mit Natriumazetat. Nach dem Trocknen des Sediments wurde dieses je nach weiterer Anwendung, statt im H<sub>2</sub>O, sofort in dem entsprechenden Puffer aufgenommen (z. B. PAGE-Ladepuffer, siehe 3.1.3.2).

Konnte man von einer niedrigen Nukleinsäurekonzentration ausgehen (z. B. nach der Einzelstrangtrennung, siehe 3.1.4), wurde Glykogen (Roche Applied Science, Mannheim/D) in einer Endkonzentration von ca. 250 ng/µl zur Kopräzipitation in die Nukleinsäure-Natriumazetat-Lösung eingesetzt. Glykogen hat bei der Fällung ein ähnliches Verhalten wie Nukleinsäuren und erhöht die Ausbeute bei geringen Ausgangskonzentrationen ohne in späteren Anwendungen zu stören.

### **3.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von Nukleinsäuren (dsDNS, ssDNS und RNS) wurde mit dem Spektralphotometer NanoDrop NP-1000 (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, MA/USA) bestimmt. Dabei wird ein patentiertes Proben-Zurückhaltungs-System eingesetzt, das die Analyse von 1 - 2 µl Probenmaterial ohne die Verwendung von Küvetten oder Kapillaren ermöglicht. Als Konstanten für die unterschiedlichen Nukleinsäuren wurden verwendet: dsDNS: 50 µg/ml, ssDNS: 33 µg/ml und RNS: 40 µg/ml. Die Extinktion (optische Dichte, OD) der Nukleinsäuren wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Der Quotient bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm wurde als Maß für die Reinheit der Nukleinsäure herangezogen. Für reine DNS

sollte er bei 1,8 und für reine RNS bei 1,8 bis 2,0 liegen. Niedrigere Werte liefern einen Hinweis auf Verunreinigungen mit Proteinen, Phenol oder anderen Substanzen, die stark bei 280 nm absorbieren.

### 3.1.7 Radioaktive Markierung von Aptameren

Die in dieser Arbeit verwendeten DNS- und RNS-Aptamere wurden in verschiedenen Bindungsanalysen auf die Bindung gegen ihr Zielprotein getestet. Dafür war es notwendig, die Aptamere zu markieren. Eine sehr sensitive Möglichkeit der Markierung bedient sich radioaktiven Nukleotiden. Im Falle von DNS erfolgte die radioaktive Markierung durch Phosphorylierung, bei RNS-Aptameren wurden radioaktive Nukleotide im Zuge der *in vitro* Transkription in die Sequenz inkorporiert.

#### 3.1.7.1 Phosphorylierung von DNS-Aptameren

Bei der Phosphorylierung überträgt eine Polynukleotid-Kinase (hier T4-PNK von New England Biolabs, Ipswich, MA/USA) Phosphat-Gruppen von ATP-Molekülen auf die 5'-Hydroxygruppen von ss- oder auch dsDNS. In dieser Arbeit wurden  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP-Nukleotide (Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig/D) eingesetzt. Die radioaktiv markierte  $\gamma$ -Phosphatgruppe wurde auf die 5'-Hydroxygruppe der DNS-Aptamere übertragen. Die Aptamere wurden entweder von der Firma Metabion (Martinsried/D) bezogen oder über eine PCR (3.1.1.2), Einzelstrangtrennung (3.1.4) und Ethanol-Fällung mit Natriumazetat (3.1.5.3) bereitgestellt.

Der Ansatz erfolgte in 1,5 ml Reaktionsgefäßen der Firma Eppendorf (Hamburg/D) nach folgenden Angaben:

ssDNS (Matrize) (1 $\mu\text{M}$ )	10 $\mu\text{l}$
10 x PNK-Puffer	2 $\mu\text{l}$
$\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP (370 kBq (10 $\mu\text{Ci}$ )/ $\mu\text{l}$ )	0,5 $\mu\text{l}$
T4-PNK	2 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu\text{l}$

Als Kontrolle wurde auch immer eine Probe ohne Matrize (Volumenausgleich mit H<sub>2</sub>O) mitgeführt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert (im Brutschrank BB5060,



Heraeus Instruments, Osterode/D) und anschließend mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden/D, siehe 3.1.5.1) aufgereinigt. Die Elution erfolgte in 50 µl H<sub>2</sub>O.

### **3.1.7.2 Herstellung radioaktiv markierter RNS-Aptamere**

Für die Herstellung radioaktiv markierter RNS-Aptamere wurden in einer in vitro Transkription α-[<sup>32</sup>P]-GTP Nukleotide (Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig/D) in die Sequenz inkorporiert. Je 1 µl dieser Nukleotide (370 kBq (10 µCi)/µl) wurde zusätzlich in den bereits unter 3.1.2 beschriebenen TK-Ansatz gegeben. Der Ansatz wurde für 4 h bei 37 °C (HERACell, Heraeus Instruments, Osterode/D) inkubiert, anschließend direkt (ohne Dnase-Verdau) mithilfe des QIAquick Nucleotide Removal Kits (Qiagen, Hilden/D, siehe 3.1.5.1) aufgereinigt und in 50 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

### **3.1.8 Filterbindungsanalyse (FBA)**

Für Bindungsstudien von Aptameren an das Zielprotein ist die Filterbindungsanalyse (FBA) eine praktische Methode, da nur sehr geringe Mengen an Proteinen und Aptameren benötigt werden und die Sensitivität durch die radioaktive Markierung sehr hoch ist. Da der Ansatz im 96-Loch-Format erfolgt, können relativ viele Werte auf einmal erzielt werden.

Für die Bindungsanalysen der RNS- und DNS-Aptamere wurde 1 µl der Lösung mit radioaktiv markierten Aptameren in einen Bindungsansatz mit steigenden Konzentrationen der entsprechenden Proteine im Selektionspuffer (final: PBS, 3 mM, MgCl<sub>2</sub>, 1 µg/µl Heparin, 1 µg/µl BSA, siehe 2.8) gegeben. Das Endvolumen betrug je 25 µl und der Ansatz erfolgte in 96-Loch-Assayplatten (BD Falcon™, Heidelberg/D). In der Regel wurden nach einer Inkubation von 40 min bei 37 °C (im Brutschrank BB5060, Heraeus Instruments, Osterode/D) 20 µl der Bindungsansätze mithilfe eines Minifold I (Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Whatman Group, Dassel/D) und einer Membranvakuumpumpe (Typ MZ 2 C, Vacuumbrand GmbH + Co. Wertheim/D) auf einen Nitrozellulosefilter (PROTRAN® BA 85, Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Whatman Group, Dassel/D) aufgebracht und anschließend mit 1000 µl Waschpuffer (5 x 200 µl) pro Loch gewaschen. Die Nitrozellulosemembran wurde für Bindungsanalysen mit DNS-Aptameren vorab für 20 min in 0,4 M KOH eingelegt und

zweimal für 10 min im Waschpuffer für DNS-Aptamere (PBS, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, siehe 2.8) gespült. Für Bindungsanalysen mit RNS-Aptameren wurde die Membran für 20 min in Kathodenpuffer (40 mM 6-Aminohexansäure, 20 % (v/v) Methanol, siehe 2.8) eingelegt und mit dem Waschpuffer für RNS-Aptamere (PBS, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05 % Tween, siehe 2.8) gespült. Unter die Nitrozellulosemembran wurde in jedem Fall ein, mit dem jeweiligen Waschpuffer befeuchtetes, Blotting Papier (GB003, Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Whatman Group, Dassel/D) in die Minifold-Apparatur gelegt.

Zur Quantifizierung wurden 0,8 µl der eingesetzten Aptamerlösungen als 100 %-Werte auf einen Rest Nitrozellulosefilter pipettiert. Die getrockneten Filter wurden in fester Frischhaltefolie (SARAN, Dow Chemical Company Midland, MI/USA) eingeschlagen, samt BAS-III S 2040 Imaging Plate (Fuji Photo Film Co. LTD, Tokyo/Japan) in eine Belichtungskassette (GEVAMATIC, Agfa-Gevaert N.V., Mortsel/B) gelegt und über Nacht exponiert. Der Film wurde mithilfe des Fuji Phosphorimager FLA-5100 (Fuji Photo Film Co. LTD, Tokyo/Japan) eingelesen und mit der Software AIDA Image Analyzer (raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt/D) und Excel (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim/D) ausgewertet. Der Wert für den Hintergrund wurde von allen restlichen Werten subtrahiert. Um die Retentionswerte zu erhalten, wurden die absoluten Werte (abzüglich des Hintergrundwerts) prozentual auf die absoluten Werte der 100 %-Daten bezogen.

Um die  $K_d$  anhand einer Filterbindungsanalyse zu bestimmen, wurde das entsprechende Zielprotein in Konzentrationen von 0 bis 1000 nM eingesetzt. Der Ansatz erfolgte in Duplikaten. Die in Excel errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der Retentionswerte wurden mithilfe der Software Kaleidagraph 4.0 mit der einfachen Lösung des Massenwirkungsgesetzes angepasst und in die Werte für den gebundenen Bruchteil („fraction bound“) umgerechnet. Diese wurden gegen die Konzentrationen des Zielproteins (logarithmische Achse) zu einer sigmoiden Kurve aufgetragen. Die  $K_d$  entspricht dem Wert für 0,5 gebundene Bruchteile und lässt sich aus der Bindungskurve leicht ablesen.

### **3.1.9 Bestimmung der Affinität von Aptameren mittels Thermophorese**

Eine vergleichsweise neue Methode zur Bestimmung von Affinitäten beruht auf der optisch erzeugten Thermophorese (engl.: „Microscale Thermophoresis“). Die Grundlagen dieses Verfahrens gehen auf den von Carl Ludwig und Charles Soret

bereits Mitte des 19. Jahrhunderts beschriebenen Effekt der Thermodiffusion (auch Ludwig-Soret-Effekt genannt) zurück (Ludwig, 1856; Soret, 1879), der die gerichtete Bewegung gelöster Moleküle in einem Temperaturgradienten bezeichnet.

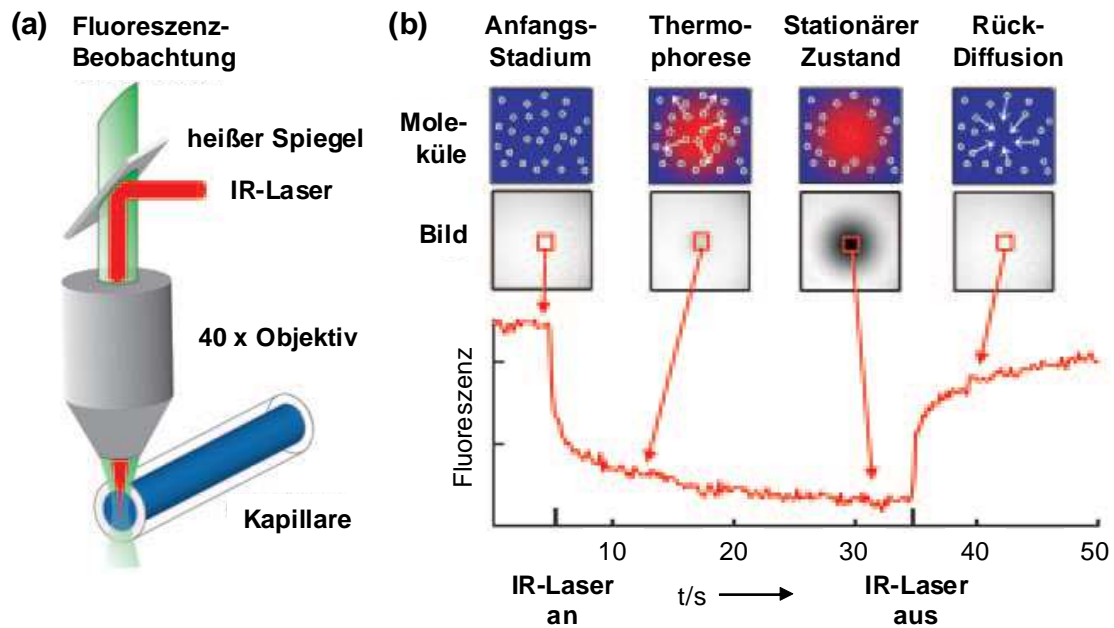
### 3.1.9.1 Prinzip der Thermophorese

Mithilfe der „Microscale Thermophoresis“ lassen sich Bindungen unter physiologischen Bedingungen, das heißt frei diffundierend in komplexen biologischen Flüssigkeiten, messen, wobei nur eine einzige positionsunspezifische Farbstoffmarkierung erforderlich ist (Duhr & Braun, 2006; Iacopini & Piazza, 2003; Reineck et al., 2010). Bei einer räumlichen Temperaturdifferenz  $\Delta T$  kommt es im Bereich erhöhter Temperatur zu einer Depletion der gelösten Biomoleküle, deren stationärer Zustand durch den Soret-Koeffizienten  $S_T$  quantifiziert wird ( $c$  = Konzentration):

$$c_{\text{hot}} / c_{\text{cold}} = \exp (-S_T \Delta T)$$

Entscheidend für die Thermophorese ist die Eigenschaft der Grenzschicht zwischen Molekül und Lösungsmittel. Unter konstanten Pufferbedingungen ist die Thermophorese von Größe, Ladung und Solvations-Entropie der Moleküle abhängig. Dabei kann bis in Konzentrationsbereiche von einigen Millimolar keine intrinsische Konzentrationsabhängigkeit beobachtet werden (Dhont, 2004; Rauch & Köhler, 2003). Durch die Bindung eines Moleküls an sein Zielprotein ändert sich typischerweise zumindest eine der oben genannten Eigenschaften. Dadurch unterscheidet sich die Thermophorese eines markierten Moleküls A deutlich von der des Komplexes AT (T steht hier für „Target“ = Zielprotein). Anhand von Titrationsexperimenten mit jeweils konstanten Pufferbedingungen wird diese bindingsinduzierte Änderung der Molekül-Thermophorese genutzt, um die Bindungskonstanten zu bestimmen.

Die Messung der Thermophorese erfolgt in Glaskapillaren, die mit ca. 5  $\mu\text{l}$  Probenmaterial befüllt werden. Die Veränderung der Fluoreszenzverteilung  $F$  wird mithilfe eines Epifluoreszenzmikroskopes als Messsignal aufgenommen (siehe Abbildung 3.1 (a)).



**Abb. 3.1: „Microscale Thermophoresis“.** (a) Die Probe innerhalb der Kapillare wird lokal mit einem fokussierten IR-Laser aufgeheizt, der mittels eines Strahlteilers in ein Epifluoreszenzmikroskop eingekoppelt wurde. (b) Eine CCD-Kamera nimmt die Fluoreszenz innerhalb der Kapillare auf und die normalisierte Fluoreszenz wird über die Zeit aufgetragen. Zum Zeitpunkt  $t = 4$  s wird der IR-Laser angeschaltet. Weil sich die farbstoffmarkierten Aptamere aufgrund ihrer Thermophorese aus dem lokal erwärmten Bereich wegbewegen, wird eine Fluoreszenzabnahme gemessen. Das Ausschalten des Lasers führt zur Rückdiffusion der Moleküle. (Abbildung adaptiert von (Baaske et al., 2010)).

Die Fokussierung eines IR-Lasers (IR = Infrarot) (1480 nm), dessen Strahlung stark von  $\text{H}_2\text{O}$  absorbiert wird, in die Flüssigkeit, führt zur Erzeugung des mikroskopischen Temperaturgradienten (Baaske et al., 2007; Duhr & Braun, 2006; Reineck et al., 2010). Dadurch kommt es lokal, das heißt im Wesentlichen auf den Bereich des Laserfokus' beschränkt, zu einer Temperaturerhöhung um  $\Delta T = 8$  K. Die Fluoreszenzverteilung  $F_{\text{cold}}$  vor dem Einschalten des IR-Lasers ist homogen (siehe Abbildung 3.1 (b)). Wird der IR-Laser eingeschaltet, führen zwei Effekte zu einer Veränderung der Fluoreszenzverteilung  $F_{\text{hot}}$ . Die beiden Effekte laufen auf unterschiedlichen Zeitskalen ab. Die Temperaturerhöhung an sich hat eine vergleichsweise kurze Reaktionszeit (50 ms) und führt aufgrund der intrinsischen Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz des Farbstoffs zu einer Fluoreszenzabnahme. Auf einer längeren Zeitskala (10 s) bewegen sich die Moleküle, bestimmt durch ihre Diffusion, vom warmen Laserfokus weg zu kühleren Bereichen (Duhr et al., 2004; Reineck et al., 2010). Durch diese Thermophorese nimmt die Konzentration lokal im warmen Laserfokus ab, bis ein stationärer Zustand erreicht ist (siehe Abbildung 3.1 (b)). Die Kinetik der Depletion, hervorgerufen durch eine Temperaturerhöhung  $\Delta T$ , wird durch die molekulare Diffusion  $D$  bestimmt. Der Soret-Koeffizient  $S_T$  gibt das stationäre Konzentrationsverhältnis  $c_{\text{hot}} /$

$c_{\text{cold}} = \exp(-S_T \Delta T) \approx 1 - S_T \Delta T$  für diese Temperaturerhöhung  $\Delta T$  an. Die normierte Fluoreszenz  $F_{\text{norm}} = F_{\text{hot}} / F_{\text{cold}}$  misst außer dem Konzentrationsverhältnis  $c_{\text{hot}} / c_{\text{cold}}$  auch die intrinsische Temperaturabhängigkeit der Farbstoff-Fluoreszenz  $\partial F / \partial T$ . Bei linearer Annäherung ergibt sich also  $F_{\text{norm}} = 1 + (\partial F / \partial T - S_T) \Delta T$ . Die normierten Fluoreszenzwerte des ungebundenen Moleküls  $F_{\text{norm}}(\text{A})$  und des Komplexes  $F_{\text{norm}}(\text{AT})$  können aufgrund der Linearität von Fluoreszenz und thermophoretischer Depletion gemäß des Superpositionsprinzips addiert werden. Das bindungsabhängige Fluoreszenz-Signal kann wie folgt beschrieben werden ( $x$  = Anteil des an das Zielmolekül gebundenen Moleküls in einer Zielmolekül-Titrationsreihe):

$$F_{\text{norm}} = (1 - x) F_{\text{norm}}(\text{A}) + x F_{\text{norm}}(\text{AT})$$

Mittels des durch Thermophorese erzeugten Fluoreszenzsignals  $F_{\text{norm}}$  ist es möglich, Änderungen von Moleküleigenschaften, wie Größe, Ladung und Solvations-Entropie, zu messen und so beispielsweise Bindungen nachzuweisen. Anders als die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie ist diese Messmethode bei der Quantifizierung von Bindungen nicht auf die Messung der üblicherweise sehr kleinen Änderungen der Diffusionskonstante  $D$  beschränkt. Ferner können Bindungen im Blutserum mit der gleichen Spezifität und Sensitivität wie Bindungen in künstlichen Puffern quantifiziert werden und so den Einfluss von komplexen Flüssigkeiten auf die Bindungsreaktion aufzeigen, was zum Beispiel bei oberflächenbasierenden Methoden wie der Oberflächen-Plasmonen-Resonanz nicht möglich ist.

### 3.1.9.2 Bestimmung der Affinität des DNS-Aptamers C10 an lösliches CD40-Ligand

Für die Bindungsanalysen mittels Thermophorese hat die Firma NanoTemper Technologies GmbH (München/D) ihr Gerät Monolith NT.115 zur Verfügung gestellt. Zur Daten-Generierung und -Analyse wurde die dazugehörige Software verwendet. Getestet wurde die Bindung des am 5'-Ende mit Cy5 fluoreszenzmarkierten DNS-Aptamers C10 an lösliches CD40-Ligand (PeproTech, Hamburg/D). Die Konzentration des Cy5-markierten Aptamers war konstant bei final 50 nM, während sCD40L von 5000 nM bis 2,44 nM in Zweierschritten titriert wurde (ergibt insg. 12 Konzentrationen). Die Bindungsanalysen wurden in verschiedenen Pufferbedingungen (final) angesetzt:

- PBS, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- Humanserum (1:2 mit PBS verdünnt)
- Vollblut (1:2 mit PBS verdünnt)

Das Aptamer wurde dafür in dem jeweiligen 2 x Puffer auf 100 nM eingestellt, die Konzentrationsreihe von sCD40L hingegen in PBS in Zwischenschritten von 10000 nM bis 4,88 nM hergestellt. 5 µl Aptamer in jeweiligem 2 x Puffer wurden mit 5 µl der jeweiligen Protein-Verdünnung in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg/D) zusammengegeben (1:1), durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt und für 30 min bei RT inkubiert (Gesamtvolumen 10 µl mit final 50 nM Cy5-Aptamer und 5000 nM bis 2,44 nM sCD40L). Mit je einer Glaskapillare wurde ein Ansatz aufgesaugt (bis zu 6 µl). Dabei wurden Reaktionsgefäß und Kapillare waagrecht gehalten. Die Kapillare befüllte sich aufgrund der Kapillarkräfte selbständig. Durch leichtes Schütteln wurde die Flüssigkeit in die Mitte der Kapillare bewegt und die Kapillare an beiden Enden mit einem Wachs-Pfropfen verschlossen. Die verschlossenen Kapillaren wurden der Reihe nach auf den Träger gelegt und von dem Gerät eingelesen. Die Quantifizierung der Bindung erfolgte durch Messung der Thermophorese zum Zeitpunkt  $t = 4$  s nach dem Einschalten des IR-Lasers.

Zum Angleichen der Messdaten wurde die Hill-Gleichung verwendet:

$$FractionBound = \frac{1}{1 + (EC_{50} / concentration)^n}$$

Bei allen Messungen war der bindungsinduzierte Anstieg des Thermophorese-Signals zu steil, um die Daten mit der einfachen Lösung des Massenwirkungsgesetzes anpassen zu können. Deshalb wurden jeweils „50 % gebunden“ Werte (EC<sub>50</sub>) und nicht K<sub>d</sub>'s berechnet.

### 3.1.10 Kopplung von Beads mit Proteinen

Für durchflusszytometrische Untersuchungen und zur Stimulation von B-Zellen wurden Dynabeads® M450-Epoxy (Invitrogen™, Karlsruhe/D) mit Zielproteinen gekoppelt. M450-Epoxy Beads sind einheitliche, superparamagnetische Polystyren-Kügelchen mit einem Durchmesser von 4,5 µm. Sie sind hydrophob und ihre Oberfläche ist mit Epoxy-

Gruppen ummantelt. Über die Epoxid-Chemie können Liganden mit Amino-, Thiol- und Hydroxygruppen immobilisiert werden.

Je Ansatz wurden 5 - 10 µg Zielprotein pro  $2 \times 10^7$  M450-Epoxy-Kügelchen nach folgendem Ablauf mithilfe des Magnetständers (DynaMag™ CTS™, Invitrogen™, Karlsruhe/D) in 2 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg/D) gekoppelt:

- 50 µl M450-Epoxy Beads (=  $2 \times 10^7$  Kügelchen) zweimal mit je 400 µl 0,1 M Na-Phosphat-Puffer (pH = 7,4) waschen
- Resuspendieren in 100 µl 0,1 M Na-Phosphat-Puffer (pH = 7,4)
- Zugabe von 5 - 10 µg Zielprotein
- Inkubation über Nacht bei 4 °C im Rollen-Mischgerät (RM 5, Karl-Hecht GmbH + Co. KG „Assistent“, Sondheim/Röhr/D)
- Dreimal mit je 400 µl Waschpuffer (1x PBS; 1 µg/µl BSA; 3 mM MgCl<sub>2</sub>) für 5 min waschen
- Resuspendieren zur gewünschten Konzentration in Waschpuffer (1x PBS; 1 µg/µl BSA; 3 mM MgCl<sub>2</sub>)

Der Erfolg der Kopplung wurde durchflusszytometrisch bestätigt (siehe 3.3.2). Die mit CD40L beschichteten Kügelchen können bei 4 °C bis zu einer Woche lang gelagert werden.

### **3.1.11 Tetramerisierung und Multimerisierung von biotinylierten Aptameren über Streptavidin**

Für Vorversuche mit multimerisierten Aptameren wurde die Streptavidin-Biotin-Bindung genutzt. Streptavidin ist ein Homotetramer, dessen Untereinheiten je ein Biotinmolekül binden können. Diese Streptavidin-Biotin-Bindung ist eine der stärksten bekannten nichtkovalenten biologischen Bindungen. In dieser Dissertation wurden biotinylierte Aptamere sowohl mit löslichem Streptavidin (unmarkiert und mit PE fluoreszenzmarkiert) tetramerisiert, als auch mit Dynabeads® M280-Streptavidin (Invitrogen™, Karlsruhe/D) multimerisiert.

### 3.1.11.1 Tetramerisierung über lösliches Streptavidin

Zur Tetramerisierung von biotinylierten DNS-Aptameren für die Durchflusszytometrie wurde PE-markiertes Streptavidin (SA-PE) von Invitrogen™ (Karlsruhe/D) mit einer Stockkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  verwendet. Die biotinylierten Aptamere (synthetisiert von Metabion, Martinsried/D, Stockkonzentration 100  $\mu\text{M}$ ) wurden in PBS, 3 mM  $\text{MgCl}_2$  zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  verdünnt, für 1 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die so vorbereiteten Biotin-Aptamere wurden in 1,6 ml Reaktionsgefäßen (amber, Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf/D) im molaren Verhältnis 4:1 mit SA-PE vermischt und für 20 min bei RT im Dunklen inkubiert. Dieses Gemisch wurde je nach Bedarf mit dem entsprechenden Inkubationspuffer für den Markierungsansatz (z. B. Medium oder Selektionspuffer) so vermengt, dass in 25  $\mu\text{l}$  5 pmol SA-PE und 20 pmol Biotin-Aptamer enthalten waren. Für einen Markierungsansatz für die Durchflusszytometrie wurden diese 25  $\mu\text{l}$  zu den zu markierenden Zellen oder den CD40L beschichteten M450 Epoxy-Kügelchen gegeben. Markierungsansätze wurden mit einem Endvolumen von 100  $\mu\text{l}$  angesetzt, die Endkonzentration von SA-PE war somit immer 50 nM, die des Biotin-Aptamers 200 nM (Markierungsansätze für die Durchflusszytometrie siehe 3.3.3.2).

Zur Tetramerisierung von biotinylierten DNS-Aptameren für die funktionalen Untersuchungen im zellulären System wurde unmarkiertes lösliches Streptavidin (SA) der Firma Roche Applied Science (Mannheim/D) in  $\text{H}_2\text{O}$  zu 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (= 166,6  $\mu\text{M}$ ) gelöst. Die biotinylierten DNS-Aptamere wurden von der Firma Metabion (Martinsried/D) synthetisiert und in einer Stockkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  geliefert. Biotin-Aptamer und SA wurden im molaren Verhältnis von 4:1 vermischt und mit 10 x PBS und  $\text{H}_2\text{O}$  auf final PBS eingestellt und 20 min bei RT inkubiert. Das tetramerisierte DNS-Aptamer wurde in steigenden Konzentrationen in funktionale Versuche eingesetzt.

### 3.1.11.2 Multimerisierung über Dynabeads® M280-Streptavidin

Die Dynabeads® Streptavidin sind einheitliche, superparamagnetische Kügelchen mit einem Durchmesser von 2,8  $\mu\text{m}$ . Eine Streptavidin-Schicht ist kovalent an die Oberfläche der Kügelchen gebunden.



Pro Ansatz wurden 4 - 40 pmol biotinylierte DNS-Aptamere (synthetisiert von Metabion, Martinsried/D) pro  $1 \times 10^7$  Streptavidin-Kügelchen nach folgendem Ablauf mithilfe des Magnetständers (DynaMag™ CTS™, Invitrogen™, Karlsruhe/D) in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg/D) gebunden:

- 15 µl M280 SA-Kügelchen ( $= 1 \times 10^7$  Beads) 2 x waschen mit je 500 µl 1 x B+W-Puffer
- Beads aufnehmen in 15 µl 1 x B+W-Puffer
- Zugabe des Biotin-Aptamers in entsprechender Konzentration
- Zugabe von 1 x B+W-Puffer zu einem Gesamtvolumen von 100 µl
- Inkubation für 15 min bei RT im Schüttler (ca. 750 rpm, Thermomixer, Eppendorf, Hamburg/D)
- 1 x Waschen der Beads mit 500 µl 1 x B+W-Puffer
- 2 x Waschen der Beads mit Puffer (je nach Bedarf für weiteren Gebrauch, z. B. Medium)
- Aufnehmen der Beads in 50 µl des entsprechenden Puffers ( $= 2 \times 10^5$  Kügelchen/µl)

Zum Einsatz kamen 4 µl der so vorbereiteten SA-Kügelchen ( $= 8 \times 10^5$  Beads) in einen Inkubationsansatz von 50 µl Gesamtvolumen. Das heißt, die maximal mögliche Aptamerkonzentration lag bei 6,4 bis 64 nM.

## 3.2 Arbeiten mit humanen Zellen

### 3.2.1 Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) aus Vollblut

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes können anhand einer Dichtegradienten-Zentrifugation von den anderen Bestandteilen des Blutes getrennt werden. Dazu wurde heparinisiertes Blut 1:1 in 50 ml Reaktionsgefäßen (BD Falcon<sup>TM</sup>, Heidelberg/D) mit PBS vereint. Jeweils 25 ml dieses Blut-PBS-Gemisches wurden vorsichtig in 50 ml Röhrchen über 25 ml Ficoll geschichtet. Die Dichtegradienten-Zentrifugation erfolgte bei 2500 rpm für 20 min ohne Bremse. Anschließend wurden die mononukleären Zellen vorsichtig aus der Interphase zwischen dem Ficoll und dem Plasma-PBS-Gemisch mit einer 10 ml Einmalpipette (Costar, Corning Inc., Corning, NY/USA) abgezogen und in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß übertragen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS bei 1500 rpm für jeweils 10 min wurden die Zellsedimente vereinigt und die Zellzahl bestimmt (siehe 3.2.4). Aus den Zellen wurden entweder anschließend anhand einer Magnet-assoziierten Zellseparation bestimmte Zellpopulationen isoliert (siehe 3.2.2), oder sie wurden in RPMI-Medium für frisch isolierte Zellen (RPMI-1640, 1 % HS, 1 % L-Glutamin, 1 % Pen/Strep, siehe 2.8) auf  $1 \times 10^6$  Zellen pro 1 ml eingestellt und im Zellinkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> (HERACell, Heraeus Instruments, Osterode/D) bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in der Megafuge 1.0 (Heraeus Instruments, Osterode/D).

### 3.2.2 Magnet-assoziierte Zellseparation (MACS)

Es gibt verschiedene Verfahren, um aus einem größeren heterogenen Zellgemisch (z. B. aus peripheren mononukleären Blutzellen) spezifische Zellpopulationen (z. B. CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten) zu isolieren. Eine einfache Methode ist die magnetisch aktivierte Zell-Sortierung (kurz MACS = „Magnetic Activated Cell Sorting“). Dabei werden die Zellen mit Antikörpern inkubiert, die mit kleinen Metallkügelchen (sog. „Microbeads“) fusioniert werden. Anschließend erfolgt die Trennung der gebundenen von den nicht gebundenen Zellen durch einen Magneten. Es bietet sich zum einen die Möglichkeit einer **positiven Selektion**, bei der die Zellfraktion von Interesse direkt mit spezifischen Antikörpern markiert und von den restlichen Zellen separiert wird. Der Vorteil dieses

Verfahrens liegt in der meist besseren Reinheit der Zielzellfraktion. Zum anderen gibt es die Möglichkeit einer **negativen Selektion** bzw. **Depletion**, bei der die Antikörper an verschiedene Marker der nicht gewünschten Zellen binden und diese aus dem Zellgemisch depletiert werden. Dieses Vorgehen bringt den Vorteil einer unberührten (ohne vorherigen Antikörperkontakt) Zielzellfraktion mit sich.

### 3.2.2.1 Isolation von B-, T- und CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus PBMC

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene isolierte Zellpopulationen verwendet. Die Aufreinigung von humanen B-, T- und CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus PBMC erfolgte mithilfe der von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach/D) kommerziell angebotenen Systeme mittels negativer Selektion (B cell Isolation Kit II, human, Pan T cell Isolation Kit II, human, CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II, human). Dabei wurden alle ungewünschten Zellen (z. B. NK-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten usw.) aus der Zellsuspension depletiert, indem man sie mit einer Mischung aus Biotin-konjugierten Antikörpern gegen spezifische Marker und Anti-Biotin-Kügelchen magnetisch markierte. Die Durchführung der Separation richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Sämtliche Zentrifugationsschritte erfolgten in der Megafuge 1.0 (Heraeus Instruments, Osterode/D). Die gezählten Zellen wurden abzentrifugiert (1500 rpm, 10 min) und in 40 µl MACS-Puffer (PBS, 0,5 % BSA, siehe 2.8) pro  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert. Nach der Zugabe von 10 µl Biotin-Antikörper-Mischung pro  $1 \times 10^7$  Zellen wurde der Ansatz gemischt und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 30 µl MACS-Puffer und 20 µl magnetische Anti-Biotin-Kügelchen pro  $10^7$  Zellen zugesetzt und für weitere 15 min bei 4 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit MACS-Puffer (Zentrifugation 1500 rpm, 10 min) wurden bis zu  $1 \times 10^8$  Zellen in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und auf eine LS-Säule (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D) geladen, die mit MACS-Puffer befeuchtet und an einem Magneten fixiert worden war. Dadurch verblieben die markierten unerwünschten Zellen in der Säule, während das Säuleneluat die unmarkierten Zellen von Interesse enthielt. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde die Säule dreimal mit je 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Nach der Isolation der gewünschten Zellen wurde die Zellzahl mithilfe einer Neubauerzählkammer (siehe 3.2.4) und die Reinheit mittels Durchflusszytometrie bestimmt (siehe 3.3.2). Dafür wurden die Zellen auf die Expression des jeweils typischen Markers für den entsprechenden Zelltyp untersucht (für B-Zellen CD19 oder CD20, für T-Zellen CD3 und für CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD4 und CD3). Zusätzlich wurde ermittelt, ob eine

Kontamination mit anderen Lymphozyten vorliegt. Für die Versuche dieser Arbeit wurden isolierte Zellpopulationen mit einer Reinheit von mindestens 95 % eingesetzt.

### 3.2.2.2 Aptamer-basierte Zellseparation

In dieser Arbeit wurde unter anderem untersucht, ob sich auf der Basis von Aptameren eine Zellseparation durchführen lässt. Dafür wurden die in einer üblichen MACS eingesetzten Antikörper durch DNS-Aptamere mit einer Biotinylierung am 5'-Ende ersetzt. Zwei verschiedene Ansätze zur positiven Selektion wurden untersucht. Zum einen wurden Zellen mit biotinylierten CD40L-spezifischen DNS-Aptamer-Monomeren markiert und über Anti-Biotin-Beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D) separiert. Zum anderen wurden die Zellen mit über Streptavidin-PE (Invitrogen<sup>TM</sup>, Karlsruhe/D) tetramerisierten biotinylierten CD40L-DNS-Aptameren (siehe 3.1.11.1) markiert und anschließend über Anti-PE-MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D) getrennt. Zum Einsatz kamen sowohl CD4<sup>+</sup> T-Zellen, als auch PBMC, nach Stimulation mit PMA / Ionomycin (siehe 3.2.5.1) über Nacht zur Aufregulation von CD40L auf der Oberfläche der T-Zellen (Aufregulation wurde vorab durchflusszytometrisch untersucht, siehe 3.3.2). Als Kontrolle wurden auch immer unstimulierte (CD40L<sup>-</sup>) Zellen und eine unspezifische Zufalls-DNS-Sequenz mitgeführt. Die Durchführung orientierte sich an den Herstellerangaben. Sämtliche Zentrifugationsschritte erfolgten in der Megafuge 1.0 (Heraeus Instruments, Osterode/D). Die Zellzahl der stimulierten und unstimulierten Zellpopulationen wurde mithilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt (siehe 3.2.4), je die Hälfte der Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß (BD Falcon<sup>TM</sup>, Heidelberg/D) gegeben und einmal mit PBS gewaschen (Zentrifugation 15000 rpm, 10 min). Bis zu  $1 \times 10^7$  Zellen wurden in 400 µl Inkubationspuffer (PBS, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 U/ml Heparin-Natrium, 1 µg/µl BSA, siehe 2.8) resuspendiert. 200 pmol Aptamer-Monomer bzw. 50 pmol Aptamer-Tetramer (über SA-PE, siehe 3.1.11.1) wurden pro  $1 \times 10^6$  Zellen zugegeben und der Ansatz gut gemischt. Nach einer Inkubation von 15 - 20 min im Dunklen (v. a. die Ansätze mit SA-PE!) bei RT wurden die Zellen mit 5 - 10 ml Waschpuffer (FACS-Aptamer-Waschpuffer: PBS, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 U/ml Heparin-Natrium, siehe 2.8) gewaschen (Zentrifugation 15000 rpm, 10 min). Das Zellsediment wurde laut Herstellerangaben in 80 µl MACS-Puffer (PBS, 0,5 % BSA, siehe 2.8) pro  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert, 20 µl Anti-Biotin-Beads bzw. Anti-PE-MicroBeads pro  $1 \times 10^7$  Zellen zugegeben, gut gemischt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit MACS-Puffer (Zentrifugation 15000 rpm, 10 min) wurden bis zu  $1 \times 10^8$  Zellen in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und auf eine MS-Säule (Miltenyi

Biotec, Bergisch Gladbach/D) geladen, die mit MACS-Puffer befeuchtet und an einem Magneten fixiert worden war. Dadurch sollten die mit Aptameren markierten CD40L<sup>+</sup> Zellen in der Säule verbleiben, während das Säuleneluat die CD40L<sup>-</sup> Zellen enthielt. Um die Reinheit zu erhöhen, wurde die Säule dreimal mit je 500 µl MACS-Puffer gespült. Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die in der Säule verbliebenen Zellen mit 1 ml MACS-Puffer sowie mithilfe des Stempels in ein neues Röhrchen gedrückt. Die Zellzahlen der Positiv- und Negativ-Fraktion wurden bestimmt (siehe 3.2.4) und die Reinheit der Zellen durchflusszytometrisch durch Markierung mit dem anti-CD40L-PE-Antikörper (BD Pharmingen<sup>TM</sup>, Heidelberg/D) untersucht. Zur Verbesserung von Reinheit und Ausbeute wurden im Rahmen dieser Arbeit einige Schritte zusätzlich in veränderter Weise durchgeführt. So wurden die MS-Säulen auch mit 6 x 500 µl MACS-Puffer gespült, die gebundenen Zellen mit 2 ml MACS-Puffer eluiert und auch einmal die biotinylierten Aptamer-Monomere erst mit Anti-Biotin-Beads multimerisiert und dann gemeinsam auf die Zellen gegeben.

### **3.2.3 Kultivierung von humanen Zellen**

Die Arbeiten zur Kultivierung der Zellen wurden mit sterilem Material, Lösungen und Medien bei sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank durchgeführt, um Kontaminationen mit Bakterien, Hefen oder Pilzen zu vermeiden. Die Zellen wurden in einem Brutschrank (HERACell, Heraeus Instruments, Osterode/D) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

#### **3.2.3.1 Kultivierung von Suspensionszelllinien**

Die humanen Suspensionszelllinien Ramos, Raji und Jurkat wurden in RPMI 1640-Medium für Zellkultur (für Zelllinien, RPMI-1640, 10 % FBS, 1 % L-Glutamin, 1 % Pen/Strep, siehe 2.8) kultiviert. Die Kultur der Suspensionszellen erfolgte in stehenden 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (TPP®, Trasadingen/CH) in 28 ml Medium. Zweimal pro Woche (alle drei bis vier Tage) wurden 21 ml (= ¾) der Zellsuspension entfernt und 21 ml frisches Medium zugegeben.

### 3.2.3.2 Kultivierung von PBMC, T- und B-Zellen aus frischem Blut

Es wurden  $0,75 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^6$  PBMC, T- oder B-Zellen pro 1 ml RPMI-Medium für frisch isolierte Zellen (RPMI-1640, 1 % HS, 1 % L-Glutamin, 1 % Pen/Strep, siehe 2.8) kultiviert. Je nach Versuchsanforderung wurden die Zellen in stehenden 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (TPP®, Trasadingen/CH) oder in 96-Loch-Rundboden-Testplatten (TPP®, Trasadingen/CH) für die Dauer des Versuchs gehalten. Je nach Bedarf wurden verschiedene weitere Zusätze in die Zellsuspension gegeben, z. B. zur Stimulation (siehe 3.2.5, 3.2.6 und 3.2.7).

### 3.2.4 Bestimmung der Zellzahl pro ml (Neubauer-Zählkammer)

Zur Ermittlung der Zellzahl und Überprüfung der Vitalität der Zellen wurden diese mit Trypanblau (0,4 %, Sigma-Aldrich, München/D) gefärbt. Dabei nehmen nur tote Zellen den Farbstoff aufgrund der defekten Zellmembran auf und erscheinen im Mikroskop dunkelblau. 25 µl aus der Zellsuspension wurden mit 75 µl Trypanblau (1:4) verdünnt und davon 10 µl in den Zwischenraum einer Neubauer-Zählkammer (Labor Optik, Freidrichsdorf/D) aufgetragen. Durch ein Invertmikroskop (Telaval 31, Carl Zeiss, Jena/D) wurden die ungefärbten Zellen in mindestens zwei Großquadraten, bestehend aus 16 Kleinquadraten, gezählt und der Durchschnittswert pro Großquadrat ermittelt. Die Multiplikation dieses Wertes mit dem Kammer- ( $= 1 \times 10^4$ ) und Verdünnungsfaktor ( $= 4$ ), ergibt die Zellanzahl pro ml Suspension. Die Gesamtzellzahl errechnet sich aus dem Wert pro ml multipliziert mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension.

Die allgemeine Berechnungsformel lautet:

$$\text{Zellen / ml} = \frac{\text{Gezählte Zellen}}{\text{Ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} \cdot \text{Kammertiefe (mm)} \cdot \text{Verdünnung ml}}$$

### 3.2.5 Stimulation von T-Zellen zur Aufregulation der CD40L-Expression

Bei Aktivierung und Stimulation von T-Zellen kommt es unter anderem zu einer Aufregulation der CD40L-Expression auf der Zelloberfläche. In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden zur in vitro Stimulation von T-Lymphozyten durchgeführt. Dabei kamen sowohl aufgereinigte T-Zellen (CD3<sup>+</sup>) und CD4<sup>+</sup> T-Zellen, als auch T-Zellen innerhalb von Gesamt-PBMC zum Einsatz.

### 3.2.5.1 PMA / Ionomycin

Der effektivste bekannte Weg zur schnellen und maximalen CD40L-Expression erfolgt über die TCR-unabhängige in vitro Stimulation mit Ionomycin in Kombination mit PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat, beides von Sigma-Aldrich, München/D). Ionomycin führt zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, wodurch es zur Einleitung der Gentranskription und Akkumulation von CD40L-mRNS kommt. Die Kostimulation mit PMA erhöht und verlängert die CD40L-Genexpression über die Aktivierung der Protein-Kinase C (PKC) (Nüsslein et al., 1996; Suarez et al., 1997). Zur Stimulation wurden die Zellen (T-Zellen,  $\text{CD4}^+$  T-Zellen oder PBMC;  $0,75 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen pro 1 ml) mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Ionomycin und 50 ng/ml PMA über einen Zeitraum von 14 bis 24 h bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  (HERACell, Heraeus Instruments, Osterode/D) stimuliert. Je nach Versuchsanforderung wurden die Zellen in stehenden 75  $\text{cm}^2$ -Zellkulturflaschen (TPP®, Trasadingen/CH) oder in 96-Loch-Rundboden-Testplatten (TPP®, Trasadingen/CH) für die Dauer des Versuchs gehalten. Die Zellen wurden vor einer weiteren Verwendung (z. B. für durchflusszytometrische Analyse) einmal gewaschen.

### 3.2.5.2 Anti-CD3/CD28-Dynabeads®

Eine weitere Methode zur in vitro Stimulation von T-Lymphozyten und somit zur Aufregulation von CD40L erfolgt über Dynabeads® CD3/CD28 (Invitrogen™, Karlsruhe/D). Dazu wurden pro  $1 \times 10^6$  Zellen 5  $\mu\text{l}$  ( $= 2 \times 10^5$ ) dieser Dynabeads® CD3/CD28 in den Versuchsansatz gegeben. Dynabeads® sind gleichförmige, superparamagnetische Polystyren-Kügelchen (Durchmesser 4,5  $\mu\text{m}$ ), die mit einer optimierten Mischung aus monoklonalen Antikörpern gegen CD3 und CD28 humaner T-Zellen beschichtet sind. Der CD3-Antikörper bindet spezifisch an die  $\epsilon$ -Kette des CD3-Antigens, eine Untereinheit des T-Zell-Rezeptors. Der CD28-Antikörper erkennt das kostimulatorische CD28-Molekül, das als Rezeptor für CD80 und CD86 dient. Die Dynabeads® imitieren somit die in vivo T-Zell-Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen („antigen presenting cells“, APC), da sie sowohl die Signalkaskade über den T-Zell-Rezeptor CD3, als auch das kostimulatorische Signal über das CD28-Molekül auslösen. Die Zellen wurden je nach Versuchsanforderung über unterschiedliche Zeiträume bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  (HERACell, Heraeus Instruments, Osterode/D) in 96-Loch-Rundboden-Testplatten (TPP®, Trasadingen/CH) stimuliert.

### 3.2.5.3 T-Zell Aktivierungs-Platte

Eine ähnliche Methode zur in vitro Stimulation von T-Zellen über monoklonale Antikörper gegen CD3 und CD28 erfolgte über kommerziell erhältliche 96-Loch-Zellkulturplatten, die mit einem anti-CD3-Antikörper beschichtet sind (T-Cell Activation 96-well Assay Plates, Anti-Human CD3, von BD Biosciences, Heidelberg/D). Zur Unterstützung der Stimulation durch das kostimulatorische Signal über das CD28-Molekül wurde zusätzlich ein anti-CD28-Antikörper (Mouse Anti-Human CD28, purified NA/LE, von BD Biosciences, Heidelberg/D) eingesetzt. Die zu stimulierenden Zellen wurden in RPMI-Medium für frisch isolierte Zellen (RPMI-1640, 1 % HS, 1 % L-Glutamin, 1 % Pen/Strep, siehe 2.8) auf  $1 \times 10^6$  pro 1 ml eingestellt und verschiedene Konzentrationen an anti-CD28-Antikörper (0, 0,5 oder 5  $\mu\text{g/ml}$ ) zutitriert. Die Zellsuspensionen wurden auf die anti-CD3 beschichtete Platte mit je 200  $\mu\text{l}$  pro Loch verteilt und für die Dauer des Versuchs bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  (HERACell, Heraeus Instruments, Osterode/D) inkubiert. Als Negativkontrolle erfolgte der gleiche Ansatz in einer unbeschichteten Kontrollplatte (T-Cell Activation 96-well Assay Plates, Uncoated Control, von BD Biosciences, Heidelberg/D).

### 3.2.6 Stimulation von B-Zellen über CD40-CD40L-Interaktion

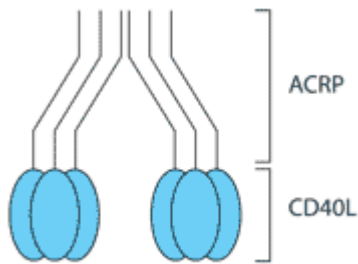
B-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche CD40. Die Interaktion mit CD40-Ligand (auf der Oberfläche aktivierter T-Lymphozyten exprimiert) führt zur Aktivierung der B-Zellen. In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden zur in vitro Stimulation von B-Zellen über diese Interaktion durchgeführt. Zur Unterstützung der Stimulation kamen immer 0,05 U/ml IL-4 (Sigma-Aldrich, München/D) zum Einsatz. Es wurden sowohl aufgereinigte B-Zellen ( $\text{CD19}^+$ ,  $\text{CD20}^+$ ) als auch B-Zellen innerhalb von Gesamt-PBMC stimuliert. Als Kontrolle für den Erfolg der Stimulation wurde die Expression der Oberflächenmarker CD86 und CD95 nach 18 h durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 3.3.2).

#### 3.2.6.1 *MegaCD40L*<sup>TM</sup>

Ein kommerziell erhältliches Produkt zur in vitro B-Zell-Stimulation über CD40 ist *MegaCD40L*<sup>TM</sup> (ENZO Life Sciences, Lörrach/D), ein Konstrukt aus zwei CD40L-Trimeren, die artifiziell über die Kollagen-Domäne des ACRP30<sup>headless</sup>



Fusionsproteins verknüpft sind (ACRP30 = Adiponektin, engl: „Adipocyte Complement Related Protein of 30 kDa“) (siehe Abbildung 3.2).



**Abb. 3.2: Graphische Darstellung von MegaCD40L™.** Das Konstrukt MegaCD40L™ besteht aus zwei CD40L-Trimeren, die über das ACRP30headless Fusionsprotein verknüpft sind. (Abbildung entnommen aus [www.enzolifescience.com](http://www.enzolifescience.com))

Das Konstrukt bindet sehr effektiv an humanes CD40 auf der B-Zell-Oberfläche und induziert dadurch die Aktivierung von B-Lymphozyten. Es kamen verschiedene Konzentrationen an MegaCD40L™ (5, 10, 50 und 100 ng/ml) zum Einsatz. Die Zellen wurden über 18 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> (HERACell, Heraeus Instruments, Osterode/D) in 96-Loch-Rundboden-Testplatten (TPP®, Trasadingen/CH) stimuliert. Das Gesamt-Volumen betrug jeweils 200 µl, die Zellzahl 1,5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Vertiefung.

### 3.2.6.2 sCD40L und Verstärkermolekül („Enhancer“) Set

ENZO Life Sciences (Lörrach/D) bietet ein weiteres Produkt zur in vitro B-Zell-Stimulation über CD40 an. Das „CD40L, Soluble (human) (recombinant) Set“ enthält die extrazelluläre Domäne des humanen CD40-Ligand (rekombinant und löslich), die am N-Terminus an ein Verbindungspeptid (6 aa) und einen Flag®-Tag fusioniert ist. Zusätzlich wird ein Verstärkermolekül (engl.: „Enhancer“) für Liganden mitgeliefert. Der Enhancer ist ein anti-Flag®-Antikörper, der durch Bindung an den Flag®-Tag das rekombinante lösliche CD40L oligomerisiert und dadurch die biologische Aktivität laut Herstellerangaben mindestens um das 1000-fache erhöht. Es wurden verschiedene Konzentrationen an löslichem CD40L (5, 10 bzw. 100 ng/ml) eingesetzt, während die Konzentration des Enhancers konstant bei 1 µg/ml war. Lösliches CD40L und Verstärkermolekül wurden für 15 min bei RT miteinander inkubiert, bevor das Gemisch mit den zu stimulierenden B-Zellen vereint wurde. Die Stimulation erfolgte in 96-Loch-Rundboden-Testplatten (TPP®, Trasadingen/CH) mit einem Gesamt-Volumen von 200 µl und 1,5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Vertiefung und wurde über 18 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> (HERACell, Heraeus Instruments, Osterode/D) inkubiert.

### 3.2.6.3 CD40L-positive T-Zellen

Ein weiterer Ansatz zur in vitro Stimulation von B-Lymphozyten über die CD40-CD40L-Interaktion ist mittels aktivierter, CD40L hochregulierter T-Zellen. Dafür wurden einerseits T-Zellen innerhalb von Gesamt-PBMC mit unterschiedlichen Mengen an Dynabeads® CD3/CD28 (Invitrogen™, Karlsruhe/D) stimuliert (0,1, 0,5 und 5 µl pro  $1 \times 10^6$  Zellen), damit es zur CD40L-Expression auf der T-Zell-Oberfläche kam (siehe 3.2.5.2), und somit die B-Zellen über die CD40-CD40L-Interaktion aktiviert wurden. Die Stimulation erfolgte in 96-Loch-Rundboden-Testplatten (TPP®, Trasadingen/CH) mit einem Gesamt-Volumen von 200 µl und  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung. Außerdem wurden isolierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Separation siehe 3.2.2.1) erst für 18 h mit 1 µg/ml Ionomycin und 50 ng/ml PMA (beides von Sigma-Aldrich, München/D) stimuliert (siehe 3.2.5.1), gewaschen und anschließend 1:1 mit B-Zellen (CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>) des gleichen Spenders vereint (autolog). Der Ansatz wurde in 96-Loch-Rundboden-Testplatten (TPP®, Trasadingen/CH) mit einem Gesamt-Volumen von 200 µl und insgesamt  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung durchgeführt.

Der Erfolg der B-Zell-Stimulation wurde jeweils nach 18 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> (HERACell, Heraeus Instruments, Osterode/D) durchflusszytometrisch bestimmt.

### 3.2.6.4 CD40L-gekoppelte Dynabeads® M450-Epoxy

Die in vitro Stimulation von B-Lymphozyten über CD40 wurde außerdem mit Dynabeads® M450-Epoxy (Invitrogen™, Karlsruhe/D) angesetzt, die mit löslichem CD40L (Recombinant human soluble CD40-Ligand, PeproTech, Hamburg/D) gekoppelt worden waren (10 µg sCD40L auf  $2 \times 10^7$  Kügelchen, siehe 3.1.10). Es wurden verschiedene Mengen an CD40L-Kügelchen pro  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt (0,35, 1,33,  $6,67 \times 10^6$ ). Die Stimulation erfolgte in 96-Loch-Rundboden-Testplatten (TPP®, Trasadingen/CH) mit einem Gesamt-Volumen von 200 µl und  $1,5 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung. Der Erfolg der B-Zell-Stimulation wurde jeweils nach 18 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> (HERACell, Heraeus Instruments, Osterode/D) durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 3.3.2). Als Negativkontrolle wurden Kügelchen mit einem anderen Protein (z. B. Lysozym aus Hühnereiweiß) gekoppelt und in Analogie eingesetzt.

### **3.2.6.5 Inhibitionskontrolle mit anti-CD40L-Antikörper 2B7**

Zur Überprüfung, ob sich die jeweilige B-Zell-Stimulation über die CD40-CD40L-Interaktion inhibieren lässt, wurde ein funktionaler, inhibierender anti-CD40L-Antikörper (2B7, von E. Kremmer) in unterschiedlichen Konzentrationen in die verschiedenen Stimulationsansätze titriert (0,25, 2,5, 25, 250 und 2500 nM).

### **3.2.7 Funktionale Analysen mit Aptameren**

Zur Analyse der funktionalen Kapazität der CD40L-spezifischen Aptamere wurden diese im zellulären System auf ihr inhibitorisches Potential getestet. Dazu wurden DNS-Aptamere in Form von Monomeren und Tetrameren (biotinylierte Aptamere über Streptavidin tetramerisiert, siehe 3.1.11.1) als potentielle Inhibitoren der B-Zell-Stimulation über die CD40-CD40L-Interaktion eingesetzt. Die monomeren DNS-Aptamere wurden in den Konzentrationen 125, 250 und 500 nM auf ihre Funktionalität getestet, die DNS-Aptamer-Tetramere in den Konzentrationen 25, 250, 500, 1250, 2500 nM (bezogen auf Streptavidin). Als Negativkontrolle wurden immer unspezifische Zufallssequenzen verwendet. In Versuchen mit über Streptavidin tetramerisierten Aptameren wurde zusätzlich auch die entsprechende Konzentration an Streptavidin als Kontrolle eingesetzt. Die Versuchsansätze erfolgten in 96-Loch-Rundboden-Testplatten (TPP®, Trasadingen/CH) mit einem Gesamt-Volumen von 200 µl und  $1,5 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung. Der Erfolg der Inhibition der B-Zell-Stimulation wurde jeweils nach 18 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> (HERACell, Heraeus Instruments, Osterode/D) durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 3.3.2).

### **3.2.8 Aptamer-basierte Verbrückung von Zellen**

In dieser Arbeit sollten verschiedene Zelltypen auf der Basis von Aptameren miteinander verbrückt werden. Dafür wurden DNS-Aptamere gegen verschiedene Zielstrukturen über Dynabeads® Streptavidin multimerisiert (siehe 3.1.11.2). Dazu wurden die zwei verschiedenen Zelltypen (eingestellt auf  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml für anschließende Durchflusszytometrie; eingestellt auf  $4 \times 10^6$  Zellen pro ml für anschließende Fluoreszenzmikroskopie) im Verhältnis 1:1 zu einem Gesamtvolumen von 50 µl vereint und im ersten Schritt mit je 2 µl Fluoreszenzfarbstoff-markierten

Antikörpern (unverdünnt) gegen den jeweiligen Linienmarker gefärbt (optimal mit FITC- und PE-Markierung). So konnten bei der anschließenden fluoreszenzmikroskopischen oder durchflusszytometrischen Untersuchung die beiden Zelltypen voneinander unterschieden werden. Nach Inkubation für 15 min bei RT in Dunkelheit und einem Waschschrift mit 1000 µl des entsprechenden Inkubationspuffers (Zentrifugation bei 2700 rpm für 3 min in der Megafuge 1.0, Heraeus Instruments, Osterode/D) wurde der Überstand bis auf etwa 50 µl abgesaugt und 4 µl der über Dynabeads® Streptavidin multimerisierten Aptamer-Heteromere (siehe 3.1.11.2) zugegeben. Um starke Scherkräfte zu vermeiden, wurde der Ansatz nur durch Schnippen vermischt und für weitere 60 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Je nach Bedarf wurden die verbrückten Zellen fluoreszenzmikroskopisch (siehe 3.2.9) oder durchflusszytometrisch (siehe 3.3.4) untersucht.

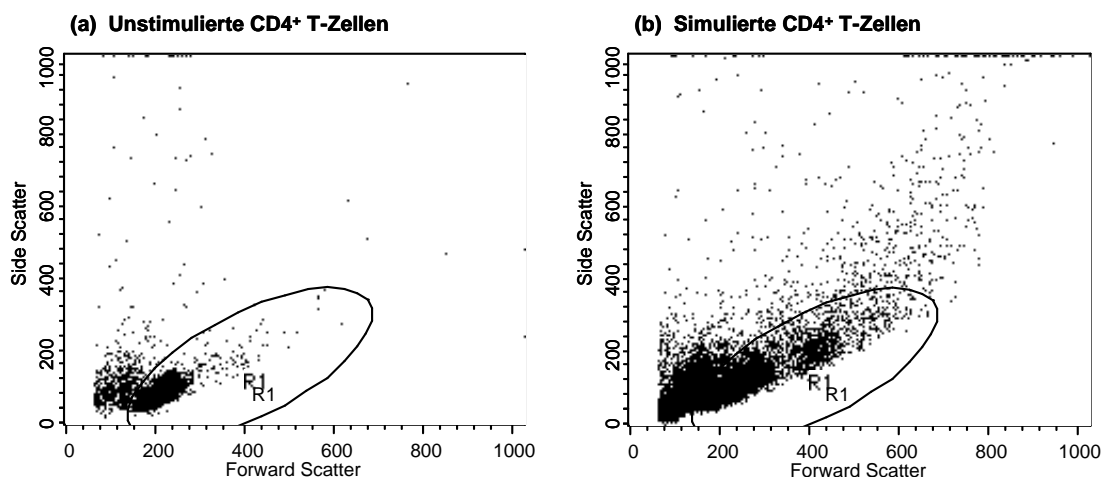
### **3.2.9 Fluoreszenzmikroskopie von Zellen**

Eine Möglichkeit zur Untersuchung von verbrückten Zellen ist die Fluoreszenzmikroskopie. Dafür wurden 30 µl des Ansatzes (siehe 3.2.8) auf einen Objektträger (76 x 26 mm, Gerhard Menzel GmbH/Thermo Fischer Scientific, Braunschweig/D) gegeben. Zusätzlich wurde ein Tropfen Eindeckmedium (DIANOVA GmbH, Hamburg/D) zugegeben, das das Ausbleichen der Fluoreszenzpräparate stark reduziert. Anschließend wurde die Probe mit einem Deckglas (24 x 40 mm, Gerhard Menzel GmbH/Thermo Fischer Scientific, Braunschweig/D) abgedeckt. Das Eindeckmedium wird fest und es entfällt die sonst übliche Fixierung mit Nagellack. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde in der Firma TRION Research GmbH (Martinsried/D) unter der Anleitung von Dr. A. Schoberth an einem BX51 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg/D) durchgeführt und mithilfe des Programms MDS (Micrometastasis Detection System, Applied Imaging Corp., San Jose, CA/USA) aufgenommen und ausgewertet.

### 3.3 Durchflusszytometrie

#### 3.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie („Fluorescence Activated Cell Sorting“, FACS) lassen sich einzelne, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Zellen anhand ihrer Größe, Granularität, intrazellulärer und auch membranständiger Moleküle charakterisieren. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Das durch Lichtbeugung hervorgerufene Vorwärtstreulicht („Forward Scatter“, FSC) zeigt die Größe der Zellen an. Die Granularität der Zellen wird durch das Seitwärtstreulicht („Side Scatter“, SSC) angezeigt, welches durch Brechung des Lichts zustande kommt. So können Zellpopulationen, die sich in Größe und Granularität unterscheiden, voneinander unterschieden werden. Anhand einer geeigneten Auswertungsstrategie durch die Bestimmung von Regionen oder Eingrenzungen („gate“) ist es möglich, einzelne Zellpopulationen getrennt voneinander in die weitere Analyse einzubeziehen (siehe Abbildung 3.3). So können zum Beispiel auch tote oder apoptotische Zellen, die eine geringere Größe, aber eine stärkere Granularität aufweisen, ausgeblendet und von der Analyse ausgeschlossen werden.



**Abb. 3.3: Beispiel von zwei-dimensionalen Punktdiagrammen („Dot-Plot“) der Lichtstreuung und der Definition des Fensters (Gate), das die Zellen repräsentiert, die in die Auswertung miteinbezogen werden sollen.** Das Vorwärtstreulicht („Forward Scatter“, FSC) ist auf der Abszisse aufgetragen und gibt die Größe der Zellen an. Die Ordinate gibt das Seitwärtstreulicht („Side Scatter“, SSC) und somit die Granularität der Zellen an. Die Zellen, die außerhalb des Gates liegen, werden ausgeblendet und somit nicht in die Analyse einbezogen. In diesem Fall wurde das Gate (R1) so gesetzt, dass es die unstimulierten (a) und über 18 h mit PMA / Ionomycin stimulierten (b) CD4<sup>+</sup> T-Zell-Populationen beinhaltet. Die Isolation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte vorab mittels negativer MACS-Separation.

Um extra- oder intrazelluläre Moleküle der Zellen nachzuweisen, werden diese mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gekennzeichnet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch einen monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. So lässt sich nicht nur der Prozentsatz an Zellen mit dem gleichen Marker innerhalb einer Population bestimmen, sondern auch die Expressionsstärke verschiedener intra- und extrazellulärer Moleküle pro Zelle als Fluoreszenzintensität ermittelt.

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden am Durchflusszytometer BD FACSCalibur™ durchgeführt, die Analyse der gewonnenen Daten erfolgte mit der Software BD CellQuest Pro™ (beides von BD Biosciences, Heidelberg/D). In der Regel wurden die Messungen nach 10.000 Ereignissen im Fenster der zu untersuchenden Zellpopulation abgestoppt.

### **3.3.2 Markierung von Oberflächenproteinen mit Antikörpern**

Zur Messung der Expression von Oberflächenmolekülen wurden Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffmarkierung eingesetzt (siehe 2.2). Für die Analyse von  $1 - 2 \times 10^5$  Zellen (in 50 bis 500 µl) wurden diese mit je 2 µl der entsprechenden unverdünnten Lösung mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gegen das zu untersuchende Oberflächenmolekül in FACS-Röhrchen (Propylene Tubes, Micronic bv, Lelystad/NL) vereint und gut vermischt. Nach einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit wurde die Zellsuspension einmal mit PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen (Zentrifugation in Megafuge 1.0, Heraeus Instruments, Osterode/D, bei 2700 rpm für 3 min). Der Überstand wurde bis auf etwa 50 µl abgesaugt (Laborpumpe, KNF Neuberger GmbH, Freiburg/D) und der Rest mit 100 µl PBS versetzt.

Für die durchflusszytometrische Analyse von Dynabeads® M450-Epoxy (Invitrogen™, Karlsruhe/D), die mit sCD40L (von Recombinant human soluble CD40-Ligand, PeproTech, Hamburg/D) gekoppelt wurden (siehe 3.1.10), erfolgte die Markierung von  $2 - 5 \times 10^5$  Kügelchen mit einem anti-CD40L-Antikörper (2 µl) nach oben beschriebenem Protokoll.

Bei jeder Untersuchung wurden Negativkontrollen mit einem irrelevanten Antikörper (Isotypkontrolle) mitgeführt.

### **3.3.3 Markierung von Oberflächenproteinen mit Aptameren**

Zur Markierung von Oberflächenproteinen, sowohl auf Zellen als auch auf Dynabeads® M450-Epoxy (Invitrogen™, Karlsruhe/D), wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Aptamere verwendet. Diese waren entweder direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert und wurden als Monomer eingesetzt, oder sie waren biotinyliert und wurden über PE-konjugiertes Streptavidin (SA-PE) (Invitrogen™, Karlsruhe/D) tetramerisiert und somit als Tetramer eingesetzt (siehe 3.1.11.1).

#### **3.3.3.1 Cy5-markierte Aptamere**

Für die Markierung von  $1 - 2 \times 10^5$  Zellen bzw.  $2 - 5 \times 10^5$  Epoxy-Kügelchen mit Cy5-markierten Aptamer-Monomeren wurden diese im entsprechenden Inkubationspuffer für den Markierungsansatz (z. B. Medium oder Selektionspuffer) mit den Aptameren in einer Endkonzentration von 300 nM versetzt (Gesamtvolumen 100 µl). Nach einer Inkubation von 15 min bei RT im Dunklen wurden die markierten Beads bzw. Zellen zweimal mit je 500 µl Waschpuffer für die FACS-Analyse mit Aptameren (PBS, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 U/ml Heparin-Natrium) gewaschen (Zentrifugation in Megafuge 1.0, Heraeus Instruments, Osterode/D, bei 2700 rpm für 3 min). Der Überstand wurde bis auf etwa 50 µl abgesaugt (Laborpumpe, KNF Neuberger GmbH, Freiburg/D) und der Rest mit 100 µl Waschpuffer versetzt.

#### **3.3.3.2 Biotinylierte Aptamere über Fluoreszenzfarbstoff-markiertes Streptavidin tetramerisiert**

Für die Markierung von  $1 - 2 \times 10^5$  Zellen bzw.  $2 - 5 \times 10^5$  Epoxy-Kügelchen mit über SA-PE tetramerisierten Aptameren (siehe 3.1.11.1) wurden diese im entsprechenden Inkubationspuffer für den Markierungsansatz (z.B. Medium oder Selektionspuffer) mit den tetramerisierten Aptameren in einer Endkonzentration von 50 nM (bezogen auf SA-PE, bzw. 200 nM Aptamer) versetzt (Gesamtvolumen 100 µl). Markierungs- und Waschbedingungen entsprachen denen für monomere Aptamere (siehe 3.3.3.1).

### **3.3.4 Durchflusszytometrie verbrückter Zellen**

Über Aptamere verbrückte Zellen (siehe 3.2.8) wurden sowohl fluoreszenzmikroskopisch (siehe 3.2.9) als auch durchflusszytometrisch untersucht. Der Verbrückungsansatz, bestehend aus zwei verschiedenen Zelltypen, die jeweils mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen einen Linien-Marker markiert waren, sowie über Dynabeads® Streptavidin multimerisierte (siehe 3.1.11.2) Aptamer-Heteromere verbrückt waren, wurde nach dem üblichen Vorgehen durchflusszytometrisch untersucht. Die Messung wurde nach 10.000 Ereignissen im Fenster R1, das die Zellpopulationen im Normalfall (Kontrolle) wiedergibt, abgestoppt. Ereignisse außerhalb dieses Fensters entsprechen toten oder apoptotischen Zellen oder auch Zellschrott (siehe auch Abbildung 4.29).



## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Molekulare Charakterisierung vorhandener CD40L-spezifischer DNS-Aptamere**

Die Selektion von DNS-Aptameren gegen lösliches humanes rekombinant hergestelltes CD40-Ligand der Firma PeproTech war anhand einer ToB-SELEX mit zwölf Selektionsrunden bereits innerhalb der Gruppe von Dr. Raymund Buhmann durchgeführt worden (ToB = „Target on Bead“, d.h. das Zielprotein wurde für den Selektionsprozess auf Dynabeads® M450-Epoxy immobilisiert). Das Prinzip der SELEX ist unter 1.4.2 beschrieben. Die Kopplung von Proteinen an Dynabeads® M450-Epoxy wurde nach der Anleitung unter 3.1.10 durchgeführt. Ausgang war die synthetische ssDNS-Startbibliothek D40 mit einer zufälligen Basenabfolge von 40 Nukleotiden, flankiert von definierten Primersequenzen (jeweils 20 Nukleotide lang, Primer: 5'-DC4, 3'-DC4). Die Selektion wurde bei 37 °C in Selektionspuffer durchgeführt (PBS, supplementiert auf final 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µg/µl Heparin, 1 µg/µl BSA). Insgesamt wurden zehn Aptamerklone gepickt und sequenziert.

Die bereits identifizierten CD40L-spezifischen DNS-Aptamere sollten im Rahmen dieser Arbeit vorerst auf molekularer Ebene charakterisiert werden, um geeignete Klone für die darauffolgenden durchflusszytometrischen und zellulären Versuchsansätze zu identifizieren. Dafür wurden die DNS-Aptamere radioaktiv markiert und in Filterbindungsanalysen auf ihre Bindung gegen unterschiedliche kommerziell erhältliche Formen von CD40L, sowie unter verschiedenen Inkubationsbedingungen getestet. Außerdem wurde die Affinität der interessantesten Aptamerklone an lösliches CD40L sowohl im Filterbindungsansatz als auch mittels Thermophorese bestimmt.

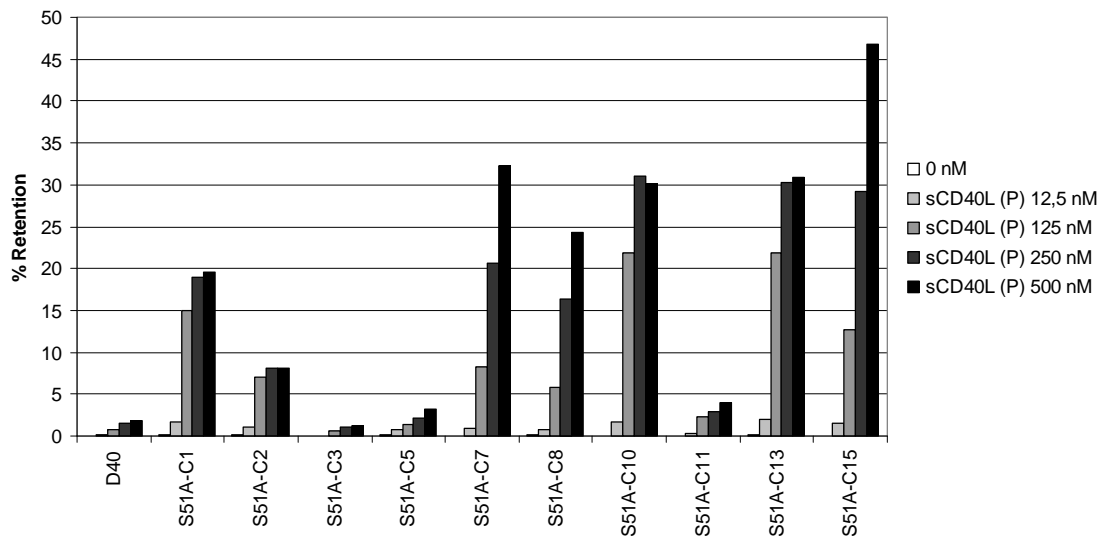
#### **4.1.1 Bindung der DNS-Aptamere an verschiedene Formen von CD40L**

Im ersten Schritt wurden die bereits identifizierten DNS-Aptamerklone gegen verschiedene kommerziell erhältliche rekombinante Formen des immunologischen Schlüsselmoleküls CD40-Ligand in Filterbindungsanalysen (siehe 3.1.8) auf molekularer Ebene charakterisiert. Die verschiedenen hier verwendeten Formen von löslichem CD40L sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

**Tabelle 4.1: Verschiedene kommerziell erhältliche rekombinante Formen des löslichen CD40L, die in dieser Arbeit verwendet wurden.**

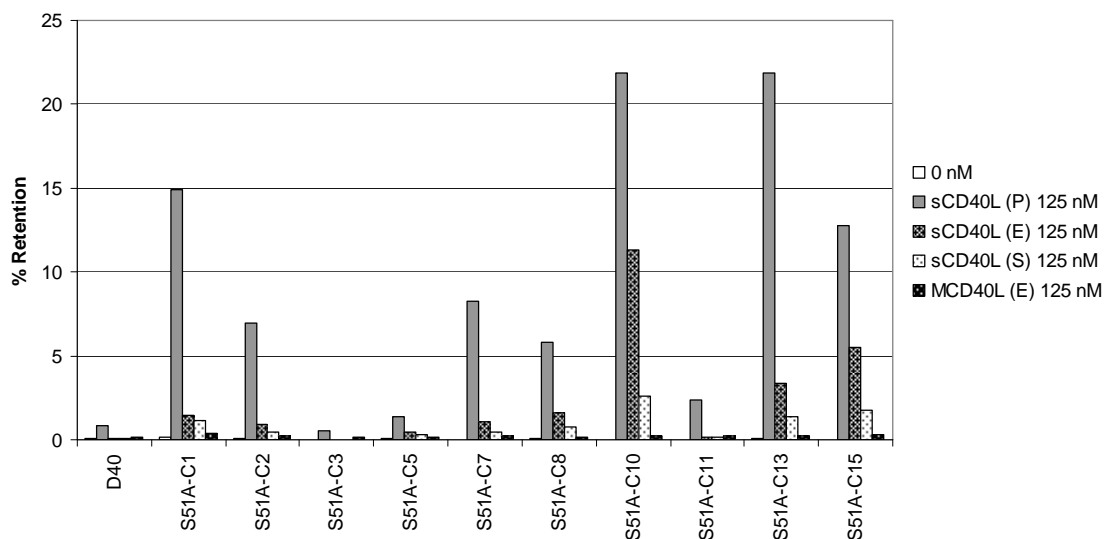
	Hersteller	Produkt-Name	Sequenz	Länge	MW	Merkmal
<b>sCD40L (P)</b>	PeproTech, Hamburg/D	Recombinant human soluble CD40-Ligand	113-261	149	16,3 kDa	-
<b>sCD40L (S)</b>	Sigma-Aldrich, München/D	CD40 Ligand human	113-261	149	16,3 kDa	-
<b>sCD40L (E)</b>	ENZO Life Sciences, Lörrach/D	CD40L, Soluble (human) (recombinant), Set mit Enhancer für Liganden	116-261	146	ca. 18 kDa	Linker-Peptid am N-terminus (6 AS) + FLAG-Tag
<b>MCD40L (E)</b>	ENZO Life Sciences, Lörrach/D	<i>Mega</i> CD40L™, Soluble (human) (recomb.)	116-261	146	ca. 35-40 kDa	Zwei CD40L-Trimere, artifiziell über die Kollagen-Domäne des ACRP30 <sup>headless</sup> Fusionsproteins verknüpft

Insgesamt wurden zehn verschiedene Klone (S51A-C1, -C2, -C3, -C5, -C7, -C8, -C10, -C11, -C13 und -C15), sowie die Startbibliothek D40 als Negativkontrolle untersucht. Die verschiedenen Sequenzen wurden zur radioaktiven Markierung mit  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP phosphoryliert (siehe 3.1.7.1) und zunächst auf ihre Bindung gegen lösliches CD40-Ligand der Firma PeproTech (sCD40L (P) = Zielprotein der Selektion) in Selektionspuffer (siehe 2.8) getestet. sCD40L (P) wurde in Konzentrationen von 0 bis 500 nM eingesetzt. Die absoluten Werte wurden mit den 100 %-Werten verrechnet, um die Retentionswerte zu erhalten. Wie in Abbildung 4.1 dargestellt, zeigten drei Aptamerklone (S51A-C3, -C5 und -C11) keine deutliche Bindung an sCD40L (P), verglichen mit der Negativkontrolle D40, während die übrigen DNS-Aptamere ein deutlich stärkeres Bindungsverhalten aufwiesen. Besonders interessant erscheinen Klone, die schon hohe Retentionswerte bei relativ niedrigen Zielprotein-Konzentrationen zeigten (z. B. S51A-C10 und -C13 bei 125 nM), da das einen Hinweis auf höhere Affinitäten liefert.



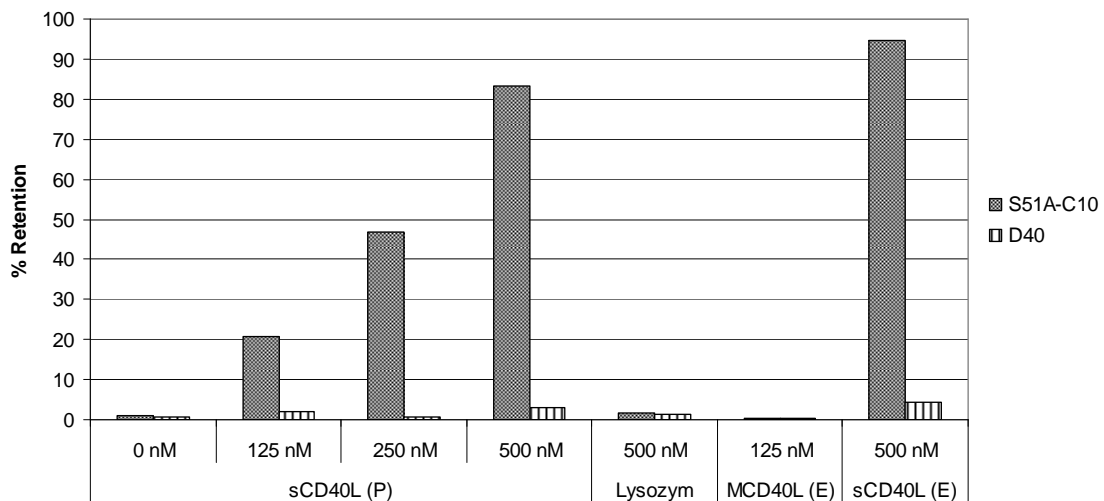
**Abb. 4.1: Bindungsreihe der DNS-Aptamere gegen lösliches CD40L-Ligand der Firma PeproTech.** Die radioaktiv markierten DNS-Aptamerklone (S51A-C1, -C2 usw.) wurden in einer Filterbindungsanalyse auf ihre Bindung an verschiedene Konzentrationen von löslichem CD40L der Firma PeproTech getestet (0, 12,5, 125, 250 und 500 nM). Als Kontrolle wurde die Startbibliothek D40 verwendet. Das Balkendiagramm stellt die Retentionswerte in % dar.

Das lösliche CD40L der Firma PeproTech ist als Monomer allein nicht zur Stimulation von B-Zellen ausreichend. Da auch die Funktionalität der Aptamere im Zellsystem untersucht werden sollte, wurden die verschiedenen Klone hinsichtlich ihrer Kreuzreaktivität gegen weitere kommerziell erhältliche Formen von CD40L (Übersicht siehe Tabelle 4.1) abgefragt. Dafür wurde die Bindung gegen je 125 nM lösliches CD40L von PeproTech (P), Sigma-Aldrich (S) und ENZO Life Sciences (E) sowie gegen 125 nM *MegaCD40L*<sup>TM</sup> in Selektionspuffer (siehe 2.8) untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2 dargestellt. Wie zu sehen ist, konnte keine Kreuzreaktivität gegen *MegaCD40L*<sup>TM</sup> gefunden werden. Die lösliche CD40L-Form von Sigma-Aldrich wurde von allen Klonen, verglichen mit der von PeproTech, nur schlecht erkannt, obwohl laut Herstellerangaben keine Unterschiede erkennbar sind. Für das CD40L-Produkt von ENZO Life Sciences ergaben sich ebenfalls schlechtere Retentionswerte, als für das Zielprotein der Selektion von PeproTech, wenn auch etwas bessere als für das Produkt von Sigma-Aldrich. Auffallend ist der Klon S51A-C10, der mit Abstand die deutlichste Bindung an die lösliche CD40L-Form von ENZO Life Sciences zeigte. Es konnte bestätigt werden, dass die Klone S51A-C3, -C5 und -C11 eine nur schwache Bindung an sCD40L der Firma PeproTech erkennen lassen.



**Abb. 4.2: Bindung der DNS-Aptamerklone an verschiedene kommerziell erhältliche Formen von CD40-Ligand.** Die radioaktiv markierten DNS-Aptamerklone (S51A-C1, -C2 usw.) wurden in einer Filterbindungsanalyse auf ihre Bindung an verschiedene Formen von CD40L (je 125 nM) getestet. Als Kontrolle kam die Startbibliothek D40 zum Einsatz. Das Balkendiagramm stellt die Retentionswerte in % dar.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen und das Bindungsverhalten des Aptamerklons S51A-C10 genauer zu untersuchen, wurde dieser in einer weiteren Filterbindungsanalyse auf seine Bindung an verschiedene Konzentrationen von sCD40L (PeproTech, 0 bis 500 nM) sowie gegen 500 nM Lysozym (Negativkontrolle), 125 nM *MegaCD40L*<sup>TM</sup> (MCD40L (E)); in geringerer Konzentration eingesetzt, weil es als CD40L-Hexamer vorliegt) und 500 nM sCD40L von ENZO Life Sciences in Selektionspuffer (siehe 2.8) getestet. Als Negativkontrolle wurde die Startbibliothek D40 verwendet. In Abbildung 4.3 sind die Ergebnisse anhand der Retentionswerte dargestellt. Den Erwartungen entsprechend war die Bindung des DNS-Aptamers C10 an das Zielprotein der SELEX sCD40L (P) sehr deutlich, während keine Bindung an Lysozym und *MegaCD40L*<sup>TM</sup> (MCD40L (E)) beobachtet wurde. Die Bindung an 500 nM sCD40L von ENZO Life Sciences war sehr stark. Dadurch konnten die vorangehenden Ergebnisse des interessanten Klons S51A-C10 bekräftigt werden.

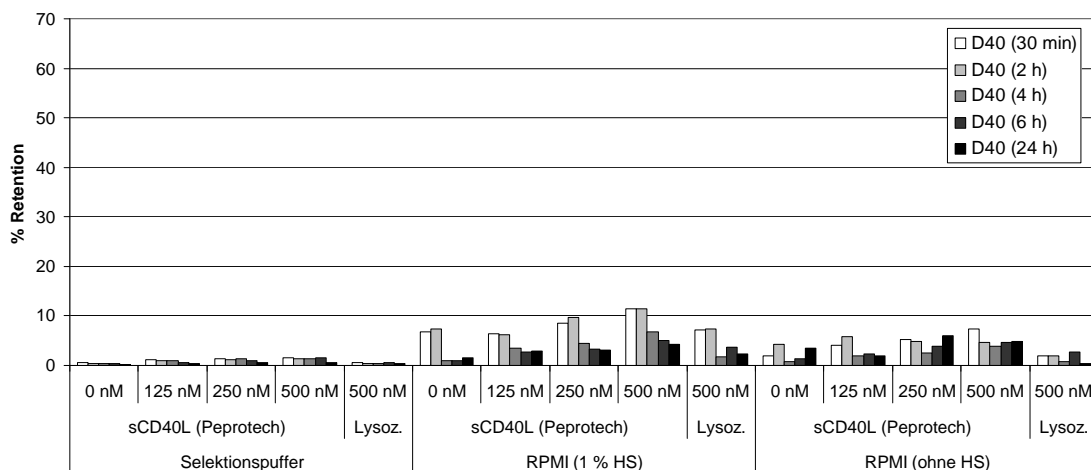


**Abb. 4.3: Bindung des DNS-Aptamers S51A-C10 an verschiedene kommerziell erhältliche Formen von CD40-Ligand.** Das radioaktiv markierte DNS-Aptamer C10 wurde in einer Filterbindungsanalyse auf seine Bindung an verschiedene Formen von kommerziell erhältlichem CD40L getestet. Dabei wurde eine Bindungsreihe des löslichen CD40L von PeproTech aufgenommen (0, 125, 250 und 500 nM). Außerdem wurde die Bindung an 125 nM *MegaCD40L*<sup>TM</sup> (ENZO Life Sciences) sowie an 500 nM lösliches CD40L ebenfalls von ENZO Life Sciences (Set mit Enhancer) getestet. Als Kontrolle für die Bindung kam die Ausgangsbibliothek D40 zum Einsatz. Lysozym wurde als Kontrollprotein verwendet. Das Balkendiagramm stellt die Retentionswerte in % dar.

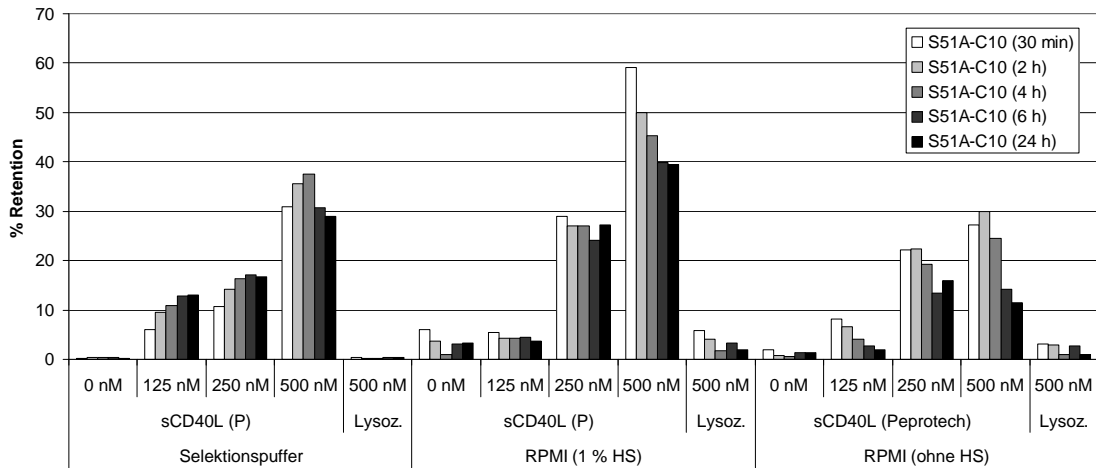
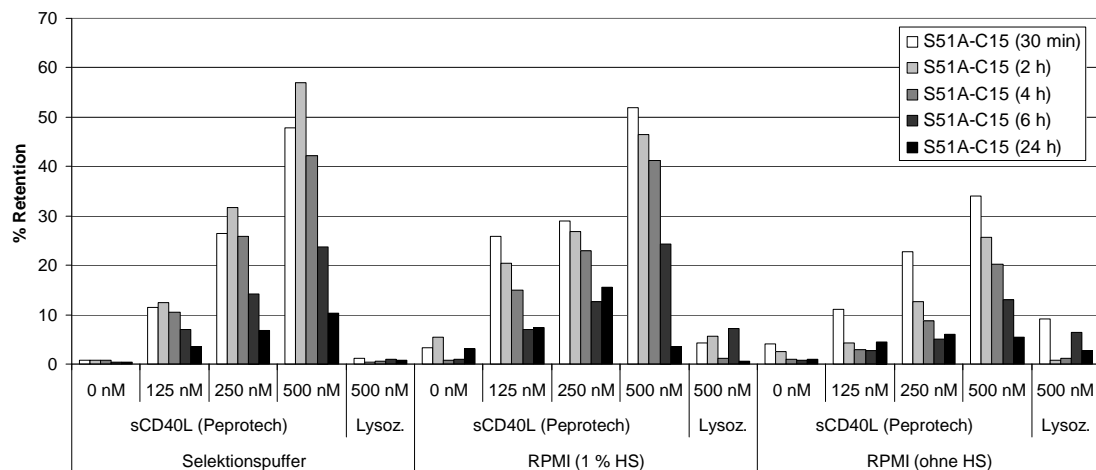
#### 4.1.2 Bindung der DNS-Aptamere in Anwesenheit von Medium mit Humanserum über die Zeit

Im Hinblick auf den späteren Einsatz der DNS-Aptamere in zellbasierten Analysen sollte die Stabilität der Aptamere in Medium untersucht werden. Dafür wurden Filterbindungsanalysen im Selektionspuffer (siehe 2.8, PBS, supplementiert auf final 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µg/µl Heparin, 1 µg/µl BSA), RPMI-Medium und RPMI-Medium versetzt mit 1 % Humanserum (1 % HS) über Inkubationszeiträume von 30 min, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h durchgeführt. Die Bindung der Aptamerklone S51A-C10 und -C15 sowie D40 als Negativkontrolle wurde gegen steigende Konzentrationen sCD40L (PeproTech) getestet. Als Kontrolle für die Spezifität wurde zusätzlich die Bindung gegen 500 nM Lysozym untersucht. Die absoluten Werte wurden mit den 100 %-Werten verrechnet, um die Retentionswerte zu erhalten. In den Abbildungen 4.4 und 4.5 sind die Ergebnisse dargestellt. Es stellte sich heraus, dass die Bindung des Klon S51A-C10 über die Zeit sowohl in Selektionspuffer als auch in RPMI (mit und ohne 1 % HS) nur in geringem Maß abnahm. Bei einem Vergleich der Bindungsdaten in Selektionspuffer und RPMI-Medium fällt auf, dass die Bindung an sCD40L in RPMI mit 1 % HS etwas

höher war als in Selektionspuffer oder RPMI ohne Humanserum. Die Hintergrundbindung (Kontrollen mit 0 nM sCD40L oder auch 500 nM Lysozym) war in RPMI durchweg höher, als in Selektionspuffer, dabei mit 1 % Humanserum noch etwas stärker als in RPMI allein. Diese Beobachtung legt eine unspezifische Bindung an Serumbestandteile nah. Die Bindung des DNS-Aptamers S51A-C15 nahm hingegen mit der Zeit in allen untersuchten Inkubationspuffern deutlich ab. Auch die Kontrolle mit der Startbibliothek D40 bestätigte eine generell erhöhte unspezifische Hintergrundbindung in RPMI mit 1 % Humanserum und etwas geringer in RPMI allein. Damit konnte ein klarer Hinweis erbracht werden, dass die Bindung des Aptamers S51A-C10 an das Zielprotein über einen Zeitraum von 24 h stabil bindet, unabhängig von den hier untersuchten Pufferbestandteilen, wie RPMI-Medium und auch Humanserum. Das ist vor allem für den späteren Einsatz von DNS-Aptameren im zellulären System von Bedeutung.



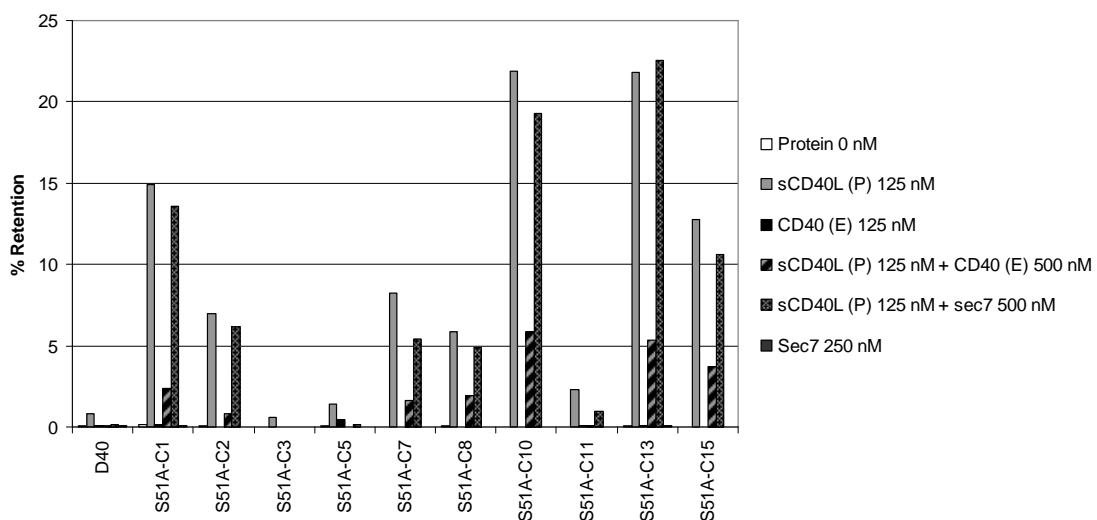
**Abb. 4.4: Bindung der DNS-Bibliothek D40 an CD40-Ligand (PeproTech) in Selektionspuffer und RPMI-Medium, (mit 1 % HS und ohne HS) nach verschiedenen Inkubationszeiträumen.** Die radioaktiv markierte DNS-Bibliothek D40 wurde als Kontrolle in einer Filterbindungsanalyse auf seine Bindung an lösliches CD40L der Firma PeproTech (0, 125, 250 und 500 nM) in Selektionspuffer und RPMI (mit 1 % HS und ohne HS) getestet. Dabei wurden die Versuchsansätze nach unterschiedlichen Zeiträumen auf den Filter gegeben (30 min, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h). Lysozym kam als Kontrollprotein zum Einsatz (500 nM). Das Balkendiagramm stellt die Retentionswerte in % dar.

**(a) Stabilität des DNS-Aptamerklons S51A-C10****(b) Stabilität des DNS-Aptamerklons S51A-C15**

**Abb. 4.5: Bindung der DNS-Aptamerklone S51A-C10 (a) und S51A-C15 (b) an CD40-Ligand (PeproTech) in Selektionspuffer und RPMI-Medium, (mit 1 % HS und ohne HS) nach verschiedenen Inkubationszeiträumen.** Die radioaktiv markierten DNS-Aptamere C10 (a) und C15 (b) wurden in einer Filterbindungsanalyse auf die Bindung an lösliches CD40L der Firma PeproTech (0, 125, 250 und 500 nM) in Selektionspuffer und RPMI (mit 1 % HS und ohne HS) getestet. Dabei wurden die Versuchsansätze nach unterschiedlichen Zeiträumen auf den Filter gegeben (30 min, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h). Lysozym kam als Kontrollprotein zum Einsatz (500 nM). Die Balkendiagramme stellen die Retentionswerte in % dar.

### 4.1.3 Konkurrenz der DNS-Aptamerbindung durch CD40

Um einen Hinweis auf die Bindungsregion der DNS-Aptamere an lösliches CD40L (P) zu erhalten, wurde untersucht, ob die Bindung durch die zusätzliche Gabe steigender Konzentrationen des natürlichen Interaktionspartners CD40 (rekombinant, von ENZO Life Sciences) zu kompetitieren ist. Dafür wurden die zehn verschiedenen Sequenzen (S51A-C1, -C2, -C3, -C5, -C7, -C8, -C10, -C11, -C13 und -C15) zur radioaktiven Markierung mit  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-ATP phosphoryliert (siehe 3.1.7.1) und in einem Vorversuch auf ihre Bindung an je 125 nM sCD40L (P) und CD40 (E), sowie an 250 nM Sec7 als Negativkontrolle, in Selektionspuffer (siehe 2.8) getestet. Sec7 hat ein Molekulargewicht von 24,3 kDa und ist durch vergleichsweise viele basische Aminosäuren (Lysin, Arginin und Histidin) auf der Proteinoberfläche ein kritisches Kontrollprotein. Außerdem wurde die Bindung der Klone an 125 nM sCD40L (P) bei der gleichzeitigen Zugabe der 4-fachen Menge an CD40 bzw. Sec7 (Kontrolle) untersucht. Anhand dieses Vorversuchs sollte das Prinzip des Ansatzes bestätigt werden, bevor eine Analyse im größeren Umfang durchgeführt wurde. Um die Retentionswerte zu erhalten, wurden die absoluten Werte mit den 100 %-Werten verrechnet.

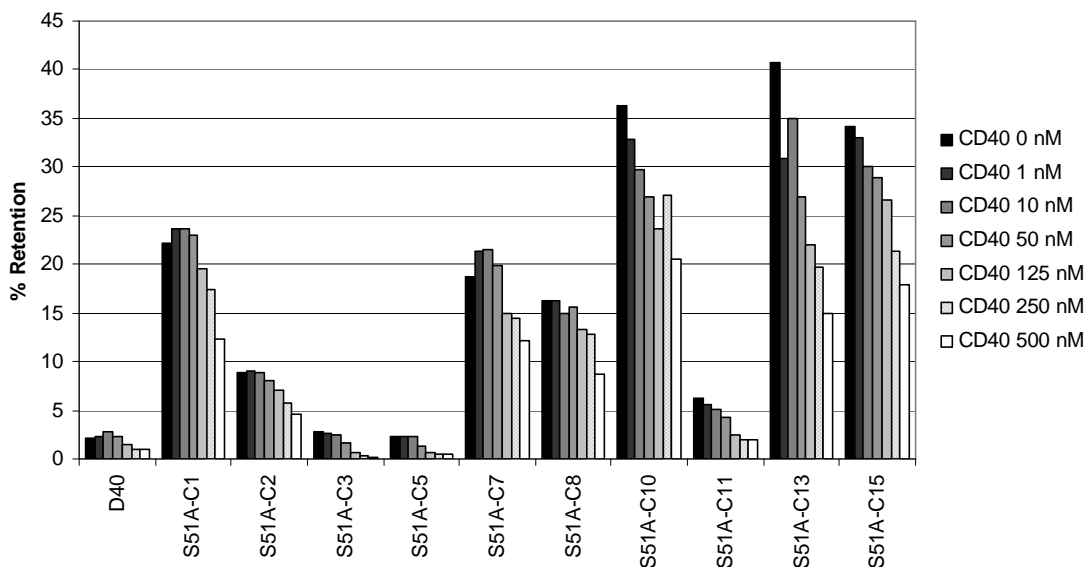


**Abb. 4.6: Vorversuch zur Bindungskompetition der DNS-Aptamere an lösliches CD40L (PeproTech) durch rekombinantes CD40.** Die radioaktiv markierten DNS-Aptamerklone (S51A-C1, -C2 usw.) wurden in einer Filterbindungsanalyse auf ihre Bindung an lösliches CD40L der Firma PeproTech (125 nM), an CD40 der Firma ENZO Life Sciences (125 nM) und an Sec7 (Negativkontrolle 250 nM) getestet. Außerdem wurde die Konkurrenz der Bindung an sCD40L durch die Zugabe der 4-fachen Menge an CD40 und Sec7 (als Kontrolle) untersucht, um das Prinzip des Versuchs für weitere Analysen im größeren Ansatz zu bestätigen. CD40 ist der natürliche Interaktionspartner von CD40L. Als Kontrolle kam die Startbibliothek D40 zum Einsatz. Das Balkendiagramm stellt die Retentionswerte in % dar.



Wie in Abbildung 4.6 dargestellt, war der Ansatz erfolgreich. Eine deutliche Bindung an 125 nM sCD40L (P) konnte bestätigt werden, wobei die gleichen Klone wie in vorhergehenden Versuchen schlecht (S51A-C3, -C5 und -C11) bzw. besser (S51A-C10 und -C13) gebunden haben. Erwartungsgemäß wurde keine Bindung an CD40 oder Sec7 detektiert. Durch die Zugabe des natürlichen Interaktionspartners CD40 im 4-fachen Überschuss (500 nM) konnte die Bindung der Aptamere an CD40L (P) deutlich reduziert werden, während die Zugabe des Kontrollproteins Sec7 keinen deutlichen Einfluss hatte.

Nachdem im Vorversuch gezeigt werden konnte, dass der Ansatz an sich funktioniert und die Zugabe des Kontrollproteins keine Wirkung auf das Bindeverhalten hatte, wurde der Versuch in größerem Maßstab wiederholt. Dabei wurde die Bindung der zehn DNS-Aptamerklone an 125 nM sCD40L (P) in Selektionspuffer (siehe 2.8) unter der Zugabe steigender Konzentrationen an CD40 (0 bis 500 nM) untersucht. Als Negativkontrolle kam die Startbibliothek D40 zum Einsatz.



**Abb. 4.7: Konkurrenz der Bindung der DNS-Aptamere an 125 nM lösliches CD40L (PeproTech) durch steigende Konzentrationen an rekombinantem CD40.** Die radioaktiv markierten DNS-Aptamerklone (S51A-C1, -C2 usw.) wurden in einer Filterbindungsanalyse auf ihre Bindung an lösliches CD40L der Firma PeproTech getestet (125 nM). Gleichzeitig wurden steigende Konzentrationen an rekombinantem CD40 (0, 1, 10, 50, 125, 250 und 500 nM) in den Versuchsansatz gegeben, um einen Hinweis auf die Bindungsregion der verschiedenen Aptamerklone zu erhalten. CD40 ist der natürliche Interaktionspartner von CD40L. Als Kontrolle wurde die Startbibliothek D40 verwendet. Das Balkendiagramm stellt die Retentionswerte in % dar.

Wie in Abbildung 4.7 dargestellt, konnten vorher erzielte Ergebnisse bestätigt werden. Die Aptamerklone S51A-C3, -C5 und -C11 zeigten die geringste Bindung an sCD40L (P). Bei allen untersuchten Klonen wurde eine konzentrationsabhängige Kompetition der Bindung an sCD40L (P) erfasst. Bei einigen Klonen war schon bei relativ niedrigen CD40-Konzentrationen ein Bindungsverlust zu beobachten (z. B. S51A-C10, -C13 und -C15), während die Bindung anderer Aptamere erst bei höheren CD40-Konzentrationen abnahm (z. B. S51A-C1, -C7 und -C8). Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass der sCD40L-Bereich, an den die untersuchten Aptamere binden, mit dem Interaktionsbereich von CD40 übereinstimmt oder zumindest teilweise überlappt. Gleichzeitig erscheint es wahrscheinlich, dass Aptamere, die sich nicht komplett durch CD40L verdrängen ließen, eine vergleichsweise hohe Affinität zu sCD40L (P) besitzen. Wieder präsentierte sich der Aptamerklon C10 als interessant und vielversprechend. In Tabelle 4.2 sind die Kompetitionswerte der Aptamerbindung an sCD40L (P) durch steigende Konzentrationen an CD40 (E) zusammengefasst.

**Tabelle 4.2: Kompetition der DNS-Aptamerbindung an 125 nM lösliches CD40L (PeproTech) durch steigende Konzentrationen an CD40 (ENZO Life Sciences).** Angegeben ist jeweils die relative Abnahme (=Kompetition) der DNS-Aptamerbindung an lösliches CD40L (P) durch die Zugabe von CD40 bezogen auf den Retentionswert der Bindung ohne Zugabe von CD40 (= 100). In grau sind die Werte der Startbibliothek D40 und die der schlecht bindenden Klone S51A-C3, -C5 und -C11 eingetragen.

	CD40						
	0 nM	1 nM	10 nM	50 nM	125 nM	250 nM	500 nM
D40	100	115	133	110	72	47	47
S51A-C1	100	107	107	104	88	78	56
S51A-C2	100	101	100	90	78	65	51
S51A-C3	100	96	87	61	25	14	8
S51A-C5	100	99	100	58	28	18	18
S51A-C7	100	113	114	106	80	77	65
S51A-C8	100	100	92	96	82	78	53
S51A-C10	100	90	82	74	65	75	57
S51A-C11	100	91	82	68	41	31	32
S51A-C13	100	76	86	66	54	48	37
S51A-C15	100	96	88	84	78	62	52

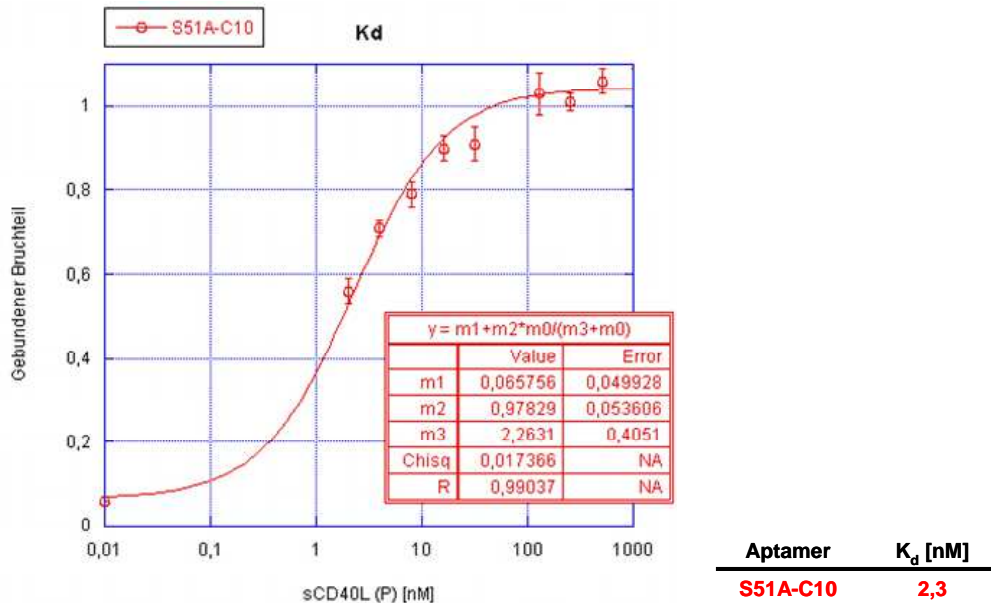
#### 4.1.4 Bestimmung der Dissoziationskonstante

Um das Bindungsverhalten der Aptamere besser zu verstehen, war es sehr wichtig, die Affinität an das Zielprotein zu bestimmen. Dafür wurden Bindungskurven des vielversprechenden Aptamers S51A-C10 sowohl mittels Filterbindungsanalyse als auch mittels optischer Thermophorese aufgenommen. Zur Ermittlung der Bindungsparameter (Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) oder effektive Konzentration 50 = „50 % gebunden“ (EC50)) wurden die klassischen graphischen Lösungsverfahren herangezogen.

##### 4.1.4.1 Filterbindungsanalyse

Die Bestimmung der Affinität von Aptameren an ihr Zielprotein kann anhand von Filterbindungsanalysen durchgeführt werden. Dafür wurde das DNS-Aptamer S51A-C10 zur radioaktiven Markierung mit  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP phosphoryliert (siehe 3.1.7.1) und auf die Bindung gegen lösliches CD40L der Firma PeproTech (= Zielprotein der Selektion, Übersicht über verwendete CD40L-Produkte in Tabelle 4.1) in Selektionspuffer (siehe 2.8) getestet. sCD40L (P) wurde in Konzentrationen von 0 bis 1000 nM eingesetzt. Der Ansatz erfolgte in Duplikaten. Die absoluten Werte wurden mit den 100 %-Werten verrechnet, um die Retentionswerte zu erhalten. Die in Excel errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der Retentionswerte wurden mithilfe der Software Kaleidagraph 4.0 mit der einfachen Lösung des Massenwirkungsgesetzes angeglichen und in den gebundenen Bruchteil („fraction bound“) umgerechnet.

Die  $K_d$  entspricht dem Wert für 0,5 gebundene Bruchteile und lässt sich aus der Bindungskurve leicht ablesen (siehe Abbildung 4.8). Mit einer  $K_d$  von 2,3 nM (= m3) kann von einer sehr hohen Affinität des Aptamers S51A-C10 (niedrig nanomolarer Bereich) ausgegangen werden.



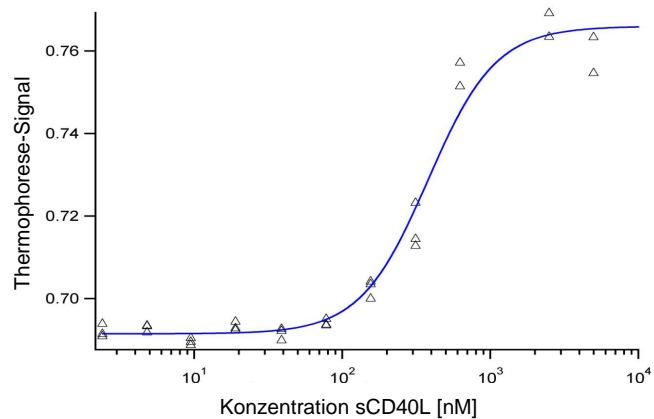
**Abb. 4.8: Ermittlung der Affinität des Aptamers S51A-C10 an sCD40L mittels Filterbindungsanalyse.** Das radioaktiv markierte DNS-Aptamer S51A-C10 wurde in einer Filterbindungsanalyse auf die Bindung an steigende Konzentrationen (0 bis 1000 nM) lösliches CD40L der Firma PeproTech getestet. Der Ansatz erfolgte in Duplikaten. Die aus den absoluten und 100 %-Werten errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit der Lösung des Massenwirkungsgesetzes angeglichen und in Werte für den gebundenen Bruchteil („fraction bound“) umgerechnet. Die nach dem Massenwirkungsgesetz errechnete  $K_d$  des DNS-Aptamers S51A-C10 (0,5 gebundener Bruchteil) ist mit 2,3 nM (= m3) im niedrigen nanomolaren Bereich.

#### 4.1.4.2 Thermophorese

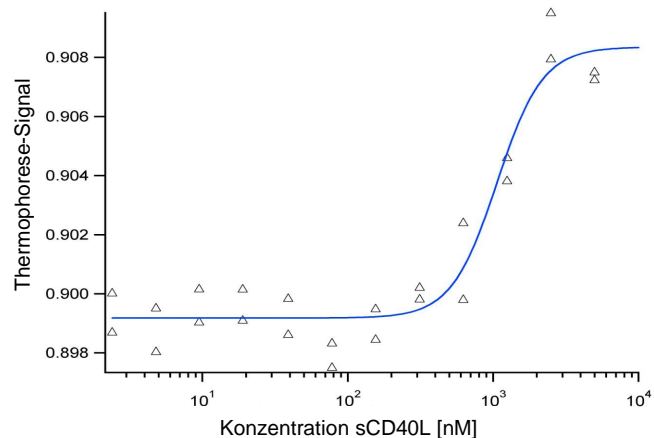
Eine weitere, vergleichsweise neue, Methode Affinitäten zu bestimmen, bedient sich der optisch erzeugten Thermophorese (engl.: „Microscale Thermophoresis“, siehe 3.1.9). Ihr größter Vorteil besteht darin, dass die Messung nicht nur frei in Lösung stattfindet, sondern es sogar möglich ist, die Bindungsstärke unter Serum- oder Vollblut-Bedingungen zu bestimmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindung des DNS-Aptamers S51A-C10 mithilfe dieser Methode genauer untersucht, da es in vorhergehenden Untersuchungen besonders vielversprechende Ergebnisse für den weiteren Einsatz lieferte. Dabei wurde ein am 5'-Ende mit Cy5 fluoreszenzmarkiertes Aptamer (synthetisiert von BioSpring GmbH) gegen seine Bindung an steigende Konzentrationen von löslichem CD40L (PeproTech) in verschiedenen Pufferbedingungen getestet.

**(a) Bindung in PBS, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>**

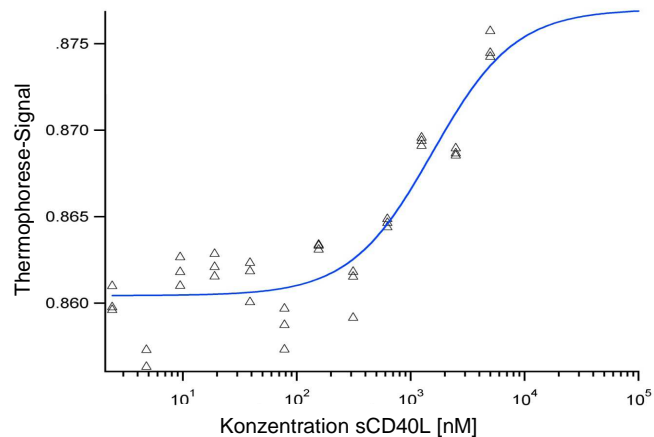
△ Rohdaten, 3 Messreihen  
 — Hill-Gleichung: EC<sub>50</sub> = 380 nM  
 n = 1,9

**(b) Bindung in 50 % Serum in PBS**

△ Rohdaten, 2 Messreihen  
 — Hill-Gleichung: EC<sub>50</sub> = 1100 nM  
 n = 2,8

**(c) Bindung in 50 % Vollblut in PBS**

△ Rohdaten, 3 Messreihen  
 — Hill-Gleichung: EC<sub>50</sub> = 1600 nM  
 n = 1,2



**Abb. 4.9: Ermittlung der Affinität des Aptamers S51A-C10 (Cy5 fluoreszenzmarkiert) an sCD40L in PBS, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (a), 50 % Humanserum (b) und 50 % Vollblut (c) mittels optisch erzeugter Thermophorese.** Die Bindung des am 5'-Ende mit Cy5 fluoreszenzmarkierten DNS-Aptamers S51A-C10 an lösliches CD40L (PeproTech) wurde in drei verschiedenen Pufferbedingungen untersucht ((a) PBS, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 Messreihen; (b) 50 % Humanserum verdünnt mit PBS, 2 Messreihen; (c) 50 % Vollblut verdünnt mit PBS, 3 Messreihen). Da der bindungsinduzierte Anstieg des Thermophorese-Signals in allen Kurven zu steil war, konnten die Daten nicht mit einer einfachen K<sub>d</sub> angepasst werden. Stattdessen wurden die Bindungen mit der Hill-Gleichung angeglichen. Der Hill-Koeffizient der jeweiligen Kurve ist mit n bezeichnet. Mit EC<sub>50</sub> wird somit „50 % gebunden“ angegeben. Die Bindung in PBS, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (a) war mit EC<sub>50</sub> = 380 nM somit affiner als in 50 % Humanserum (b) mit EC<sub>50</sub> = 1100 nM. Die Bindung in 50 % Vollblut (c) war mit EC<sub>50</sub> = 1600 nM am schwächsten.

Die Ergebnisse der jeweils zwei bzw. drei Testreihen sind in Abbildung 4.9 dargestellt. Da bei allen Messungen der bindungsinduzierte Anstieg des Thermophorese-Signals zu steil war, um die Daten mit der einfachen Lösung des Massenwirkungsgesetzes angleichen zu können, wurde stattdessen die Hill-Gleichung verwendet:

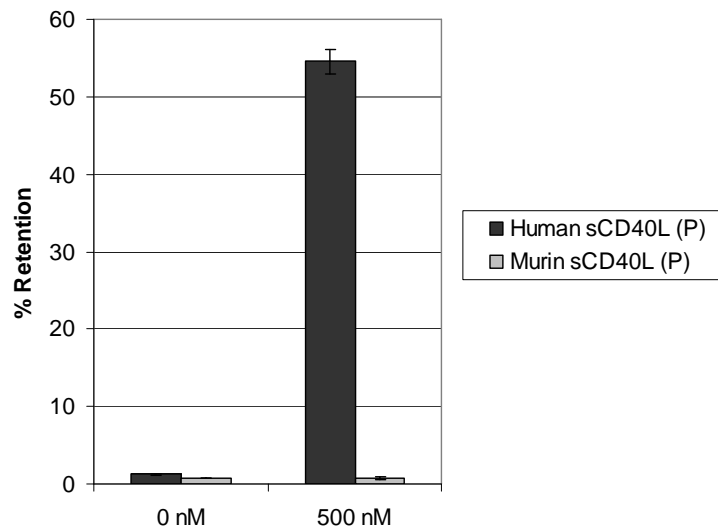
$$FractionBound = \frac{1}{1 + (EC50 / concentration)^n}$$

Deshalb wurden jeweils die Werte für „50 % gebunden“ (EC50) und nicht Dissoziationskonstanten berechnet. Da die EC50-Werte hier in jedem Fall deutlich höher waren, als die eingesetzte Konzentration des fluoreszenzmarkierten Aptamers, (50 nM), stimmen die EC50-Werte mit der Dissoziationskonstante  $K_d$  überein. Entgegen der  $K_d$  von 2,3 nM, die für S51A-C10 mithilfe von Filterbindungsanalysen errechnet wurde, ergaben die Untersuchungen mittels Thermophorese geringere Affinitäten. Wie in Abbildung 4.9 dargestellt, zeigte die Bindung des mit Cy5-markierten Aptamers C10 in PBS, 1,5 mM  $MgCl_2$  die höchste Affinität ((a)  $EC50 = 380$  nM), während in 50 % Humanserum und 50 % Vollblut (jeweils verdünnt mit PBS) die Bindung etwas schwächer war ((b)  $EC50 = 1100$  nM; (c)  $EC50 = 1600$  nM).

#### 4.1.5 Kreuzreaktivität mit dem CD40-Ligand der Maus

Da die Aptamere vor allem im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Einsatz charakterisiert werden sollten, war es wichtig zu untersuchen, ob die vorhandenen DNS-Aptamere eine Kreuzreaktivität mit dem CD40-Ligand der Maus zeigen. Diese könnte präklinische Untersuchungen im Maus-Modell stark vereinfachen.

Dafür wurde das bisher durchgängig vielversprechende CD40L-spezifische DNS-Aptamer S51A-C10 zur radioaktiven Markierung mit  $\gamma$ -[ $^{32}P$ ]-ATP phosphoryliert (siehe 3.1.7.1) und auf die Bindung an rekombinantes humanes und murines lösliches CD40L (beides von der Firma PeproTech, 0 und 500 nM) in Selektionspuffer (siehe 2.8) getestet. Der Ansatz erfolgte in Duplikaten. Die absoluten Werte der Filterbindungsanalyse wurden mit den 100 %-Werten verrechnet, um die Retentionswerte zu erhalten. In Abbildung 4.10 sind die Mittelwerte der Retentionswerte und die jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Es konnte keine Kreuzreaktivität von S51A-C10 mit dem löslichen CD40L der Maus beobachtet werden, während die Bindung an humanes lösliches CD40L wie üblich sehr stark war.



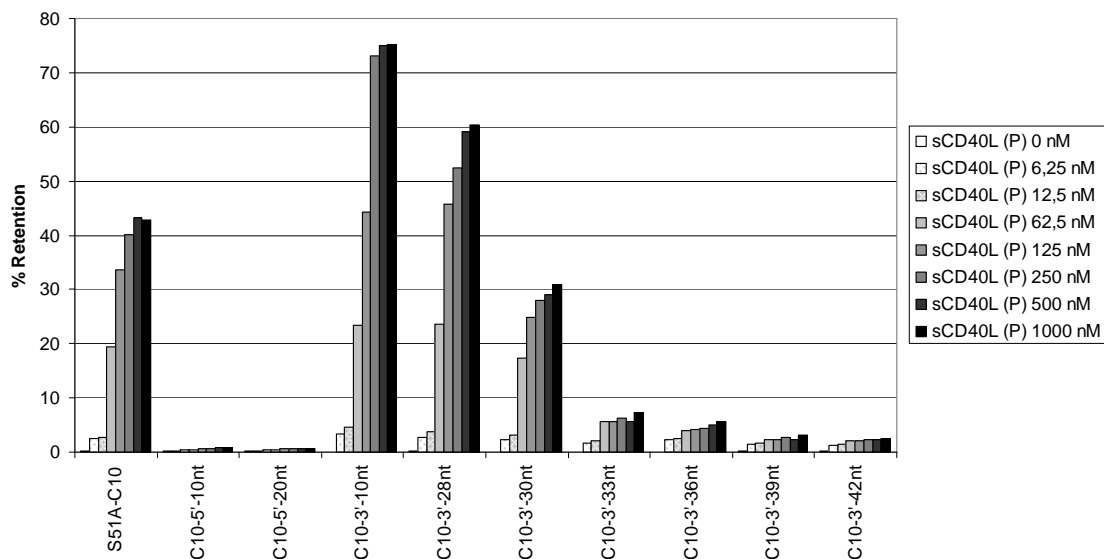
**Abb. 4.10: Bindung des CD40L-spezifischen DNS-Aptamers S51A-C10 an humanes und murines lösliches CD40-Ligand.** Das radioaktiv markierte DNS-Aptamer S51A-C10 wurde in einer Filterbindungsanalyse auf die Bindung an humanes und murines lösliches CD40L der Firma PeproTech getestet (0 und 500 nM). Der Ansatz erfolgte in Duplikaten. Das Balkendiagramm stellt die Retentions-Mittelwerte in % sowie die Standardabweichungen dar.

#### 4.1.6 Bindungsanalysen verkürzter Aptamere

Da Aptamere von 80 Basen Länge im Rahmen der chemischen Synthese keine optimale Ausbeute erreichen, sollten Bindungsanalysen mit verkürzten Aptameren durchgeführt werden. Da das Aptamer S51A-C10 in allen vorangehenden Untersuchungen sehr aussichtsreiche Ergebnisse lieferte, wurden Filterbindungsanalysen mit stufenweise verkürzten Aptameren gegen steigende Konzentrationen an sCD40L (PeproTech; 0; 6,25; 12,5; 62,5; 125; 250; 500; und 1000 nM) in Selektionspuffer (siehe 2.8) durchgeführt. Die Verkürzung des Aptamers S51A-C10 erfolgte über PCR mit entsprechenden Kombinationen an biotinylierten 3'-Primern und 5'-Primern (siehe 3.1.1.2) und anschließender Einzelstrangtrennung der doppelsträngigen PCR-Produkte (siehe 3.1.4). Für Verkürzungen vom 5'-Ende wurde der übliche biotinylierte 3'-Primer in Kombination mit 5'-Primern verwendet, die weiter in 3'-Richtung zur Vollängen-Sequenz komplementär waren, sodass die zu verkürzenden Basen am 5'-Ende überlappen und nicht weiter vervielfältigt wurden. Zur Verkürzung des 3'-Endes wurde der übliche 5'-Primer in Kombination mit biotinylierten 3'-Primern verwendet, die entsprechend nach innen versetzt komplementär zur Vollängen-Sequenz waren, sodass die zu verkürzenden Basen am 3'-Ende überlappen und nicht

weiter amplifiziert wurden. Zur radioaktiven Markierung wurden die Sequenzen unterschiedlicher Länge mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP phosphoryliert (siehe 3.1.7.1).

In Abbildung 4.11 sind die Retentionswerte dargestellt, die durch den Bezug der absoluten Werte auf die 100 %-Werte errechnet wurden. Wie zu sehen ist, führte eine Verkürzung der Sequenz vom 5'-Ende her schon ab zehn Basen zu massivem Bindungsverlust. Eine Verkürzung vom 3'-Ende her gelang hingegen um bis zu 30 Basen ohne deutlichen Bindungsverlust. Die Verkürzung am 3'-Ende um bis zu 28 Basen schien die Bindung des Aptamers S51A-C10 sogar noch zu verstärken. Somit konnte das Aptamer S51A-C10 auf eine Länge von nunmehr 52 Basen verkürzt werden, wodurch die Ausbeute im Rahmen der chemischen Synthese signifikant gesteigert werden konnte.



**Abb. 4.11: Bindungsreihen der vom 3'- bzw. 5'-Ende stufenweise verkürzten S51A-C10-Sequenzen gegen lösliches CD40-Ligand der Firma PeproTech.** Die radioaktiv markierten DNS-Aptamere (S51A-C10 und die verkürzten Sequenzen) wurden in einer Filterbindungsanalyse auf ihre Bindung an steigende Konzentrationen von löslichem CD40L der Firma PeproTech getestet (0, 62,5, 125, 250, 500 und 1000 nM). Das Balkendiagramm stellt die Retentionswerte in % dar. Während eine Verkürzung der Sequenz vom 5'-Ende her zum Bindungsverlust führt, ist eine Verkürzung vom 3'-Ende her um 28 Basen ohne Bindungsverlust möglich.



## 4.2 Durchflusszytometrische Bindungsanalysen der DNS-Aptamere

Nachdem die bereits selektierten CD40L-spezifischen DNS-Aptamere auf molekularer Ebene hinsichtlich ihrer Spezifität und Affinität, ihres Bindungsbereichs und der Möglichkeit zur Verkürzung charakterisiert wurden, sollte das vielversprechende Aptamer S51A-C10 sowie die am 3'-Ende verkürzte Version S51A-C10-28 in durchflusszytometrische Bindungsanalysen eingesetzt werden. In Tabelle 4.3 sind die Namen der im Folgenden verwendeten CD40L-DNS-Aptamere zusammengefasst.

**Tabelle 4.3: Übersicht der verwendeten CD40L-spezifischen DNS-Aptamere mit Angabe der unterschiedlichen Modifikationen sowie des im Folgenden verwendeten Namens.** Alle Aptamere werden im Folgenden über PE-konjugiertes Streptavidin tetramerisiert (SA-PE).

	Biotinylierung	Abstandhalter	Name der über SA-PE tetramerisierten Aptamere
<b>Volllängen-Aptamere S51A-C10</b>	5'	Spacer 18	SA-PE-5'B-C10 (Spacer 18)
	3'	Spacer 18	SA-PE-3'B-C10 (Spacer 18)
	5'	Spacer 36	SA-PE-5'B-C10 (Spacer 36)
	3'	Spacer 36	SA-PE-3'B-C10 (Spacer 36)
<b>Am 3'-Ende verkürzte Aptamere S51A-C10-28</b>	3'	Spacer 18	SA-PE-3'B-C10-28 (Spacer 18)
	5'	Spacer 36	SA-PE-5'B-C10-28 (Spacer 36)
	3'	Spacer 36	SA-PE-3'B-C10-28 (Spacer 36)
<b>Kontrollsequenz C10scr</b>	5'	Spacer 18	SA-PE-5'B-C10scr (Spacer 18)
	5'	Spacer 36	SA-PE-5'B-C10scr (Spacer 36)
<b>Kontrollsequenz C10-28scr</b>	5'	Spacer 36	SA-PE-5'B-C10-28scr (Spacer 36)

### 4.2.1 Affinitäts- / Aviditätssteigerung durch Tetramerisierung über Biotin-Streptavidin

Da die Affinitätsstudien mittels Thermophorese (siehe 4.1.4.2) zeigten, dass die Bindung mit EC50-Werten im niedrigen  $\mu\text{M}$ -Bereich schwächer ist als anfangs angenommen, sollten die Bedingungen für eine Tetramerisierung über Biotin-Streptavidin untersucht werden. CD40L liegt auf der Oberfläche aktivierter T-Zellen als Trimer vor. Durch die Tetramerisierung der CD40L-Aptamere sollte deren Affinität bzw. Avidität gesteigert werden (Hasegawa et al., 2008). Es sollte zum einen untersucht werden, ob freies Biotin einen Einfluss auf die Tetramerisierung hat, da spätere

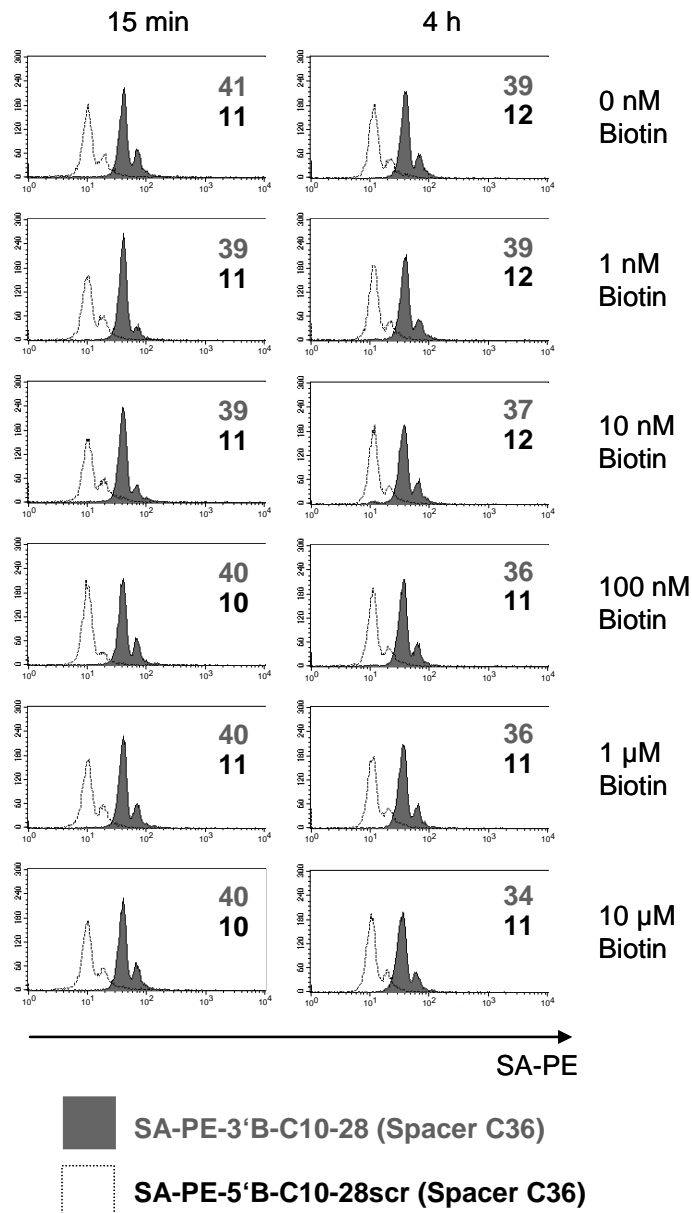
Versuche mit Lymphozyten den Einsatz von biotinhaltigem Medium, wie z. B. RPMI (820 nM Biotin), erfordern (Zempleni & Mock, 2000). Außerdem sollte festgestellt werden, ob sich durch die Orientierung (3'- oder 5'-Ende) oder die Länge des Spacers (englisch für Abstandshalter) zwischen Biotin und Aptamersequenz Unterschiede in der Bindungsstärke ergeben.

#### 4.2.1.1 Einfluss durch freies Biotin im Medium

Um den Einfluss von freiem Biotin im Bindungsansatz auf die Tetramerisierung biotinylierter Aptamere über Streptavidin zu untersuchen, wurden Dynabeads® M450-Epoxy (Invitrogen™) mit löslichem CD40L (Peprotech) gekoppelt (siehe 3.1.10). Das am 3'-Ende um 28 Basen verkürzte DNS-Aptamer C10-28 mit Biotinylierung am 3'-Ende (Spacer 36, synthetisiert von Metabion) wurde über mit PE-fluoreszenzmarkiertem Streptavidin (SA-PE, Invitrogen™) tetramerisiert (siehe 3.1.11.1). Das daraus entstandene Aptamer-Tetramer wird im Folgenden als SA-PE-3'B-C10-28 bezeichnet (siehe Tabelle 4.3). Als Kontrolle wurde die Sequenz des Aptamers C10 über die gesamte Länge durcheinander gewürfelt, wobei der Anteil der jeweiligen Basen gleich blieb. Diese Kontrollsequenz wurde mit C10scr benannt (scr. als Abkürzung für „scrambled“ = englisch für durchmischt) und ebenfalls von Metabion synthetisiert (5'-Biotin, Spacer 36) (siehe Tabelle 4.3). Der Ansatz erfolgte, wie unter 3.3.3.2 beschrieben, in einem Gesamt-Volumen von 100 µl (hier Inkubationspuffer, siehe 2.8: PBS, supplementiert auf final 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 U/ml Heparin-Natrium, 1 µg/µl BSA). Zusätzlich wurden in den Ansatz steigende Konzentrationen an Biotin (Sigma-Aldrich) gegeben (0, 1, 10, 100, 1.000 und 10.000 nM). Die Ansätze wurden für 15 min und 4 h bei 37 °C inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht.

Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 4.12 in Form von Histogrammen dargestellt. Zusätzlich sind die Werte der jeweiligen MFI (mediane Fluoreszenzintensität) in den Diagrammen angegeben. Es zeigte sich, dass keine der eingesetzten Biotin-Konzentrationen über einen Zeitraum von 4 h einen starken Einfluss auf die Tetramerisierung der Aptamere und somit auf die Bindung an die sCD40L-gekoppelten Dynabeads® M450-Epoxy über den beobachteten Zeitraum hatte. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass der Biotin-Gehalt im später eingesetzten RPMI-Medium (820 nM Biotin) ebenfalls keinen großen Effekt auf die Tetramerisierung über Biotin-Streptavidin ausübt. Der zweite Gipfel in den Histogrammen ist auf Dubletten der

Kügelchen zurückzuführen. Diese sind auch bei ungekoppelten Dynabeads® M450-Epoxy zu beobachten.

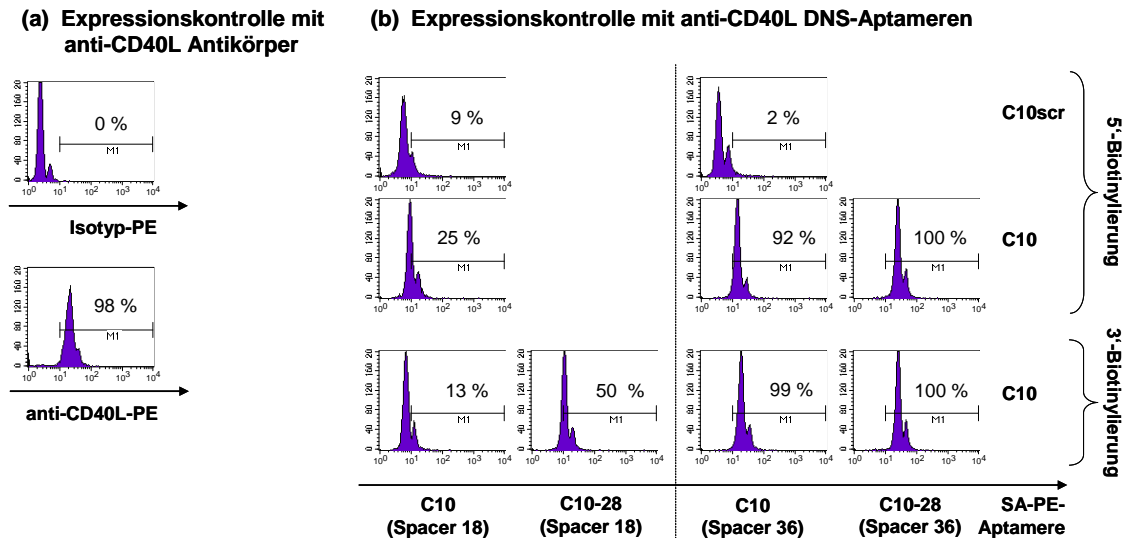


**Abb. 4.12: Durchflusszytometrische Untersuchung des Einflusses von freiem Biotin auf die Bindung von über Streptavidin tetramerisierten Biotin-Aptameren an sCD40L-gekoppelte Dynabeads® M450-Epoxy.** Dynabeads® M450-Epoxy (Invitrogen™) wurden mit sCD40L gekoppelt. Das CD40L-spezifische DNS-Aptamer C10-28 (am 3'-Ende biotinyliert, Spacer 36, dunkelgrau) wurde über PE-konjugiertes Streptavidin (SA-PE) tetramerisiert. Als Kontrolle wurde C10scr (durchgemischte Sequenz des Aptamers C10, schwarz) verwendet. In den Bindungsansatz wurden steigende Konzentrationen an Biotin gegeben (0, 1, 10, 100, 1.000 und 10.000 nM) und dieser für 15 min und 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse in Form von Histogrammen. Die jeweilige MFI (mediane Fluoreszenzintensität) ist als Zahlenwert im Diagramm angegeben.

#### **4.2.1.2 Unterschiede durch verschiedene Spacer-Längen und Spacer-Orientierung (5' vs. 3' Ende) zwischen Biotin und Aptamersequenz**

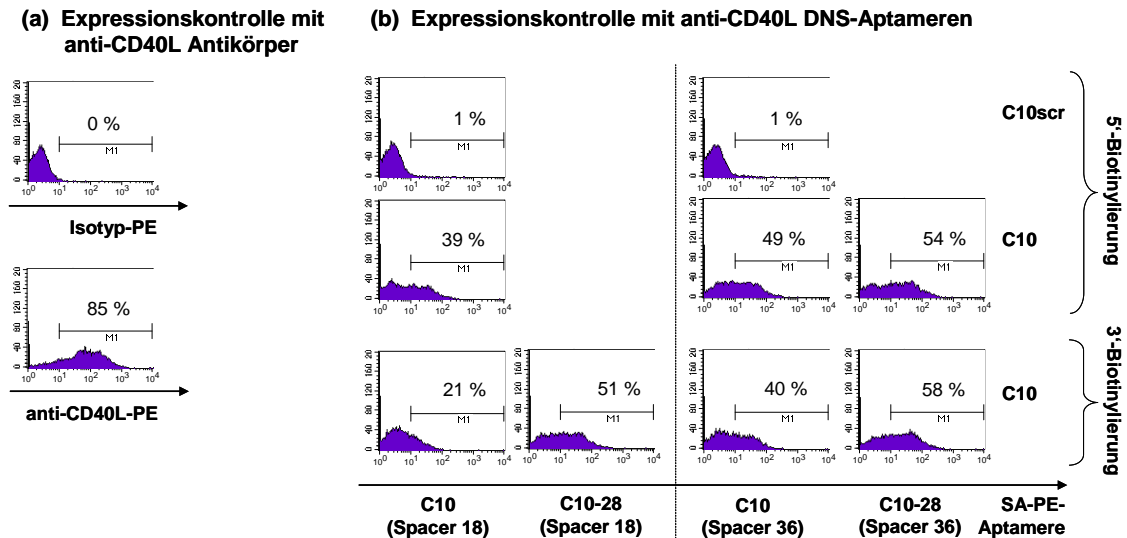
Im nächsten Schritt sollte festgestellt werden, ob sich durch die Orientierung (3'- oder 5'-Ende) oder die Länge des Abstandhalters (= Spacer) zwischen Biotin und Aptamersequenz Unterschiede im Bindungsverhalten der tetramerisierten Aptamere ergeben. Dafür wurden verschiedene biotinylierte Varianten des Aptamers C10 (Volllänge oder verkürzt) mit einem oder zwei Hexaethylenglykol-Bausteinen (HEG) (Spacer 18 oder Spacer 36) als Abstandhalter zwischen Biotin und 3'- oder 5'-Ende der Aptamersequenz synthetisiert (Metabion). Als Kontrollsequenz wurde wieder C10scr verwendet. Zur Analyse der Bindung der verschiedenen Variationen kamen sowohl Dynabeads® M450-Epoxy (Invitrogen™) zum Einsatz, die mit sCD40L (PeproTech) gekoppelt worden waren (siehe 3.1.11), als auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die über Dichtegradienten-Zentrifugation (siehe 3.2.1) und Magnet-assoziierte Zellseparation (siehe 3.2.2.1) isoliert und über 18 h mit PMA / Ionomycin stimuliert worden waren (siehe 3.2.5.1). Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurden die CD40L-Kügelchen bzw. stimulierten T-Zellen, wie unter 3.3.3.2 beschrieben, mit Aptameren markiert, die über PE-konjugiertes Streptavidin (SA-PE, Invitrogen™) tetramerisiert worden waren (siehe 3.1.11.1). Der Bindungsansatz erfolgte mit einem Gesamtvolumen von 100 µl (hier Inkubationspuffer, siehe 2.8). Zur Unterscheidung von positivem und negativem Signal wurden auch jeweils eine Messung mit einer PE-konjugierten Isotypkontrolle sowie eine Messung mit einem PE-konjugiertem anti-CD40L-Antikörper (BD Pharmingen™) durchgeführt (siehe 3.3.2).

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen sind in den Abbildungen 4.13 (CD40L-Kügelchen) und 4.14 (stimulierte T-Zellen) in Form von Histogrammen dargestellt.



**Abb. 4.13: Durchflusszytometrische Bindungsanalyse verschiedener Variationen des CD40L-spezifischen DNS-Aptamers C10 auf mit sCD40L (PeproTech) gekoppelten Dynabeads® M450-Epoxy (Invitrogen™).** Dynabeads® M450-Epoxy (Invitrogen™) wurden mit sCD40L (PeproTech) gekoppelt und mit einem anti-CD40L-Antikörper (a) sowie mit biotinylierten CD40L-Aptameren (b) abgefragt, die über PE-fluoreszenzmarkiertes Streptavidin tetramersiert worden waren. Es kamen sowohl das Volllängen-Aptamer C10 als auch die am 3'-Ende um 28 Basen verkürzte Sequenz C10-28 zum Einsatz. Die Biotinylierung war am 3'- oder 5'-Ende des Aptamers mit einem oder zwei HEG-Bausteinen (Spacer 18 oder Spacer 36) als Abstandhalter angebracht. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Form von Histogrammen dargestellt.

Bei den Aptameren mit nur einem HEG-Baustein (Spacer 18) als Abstandhalter zwischen Biotin und Sequenz zeigte das Volllängen-Aptamer mit der Biotinylierung am 5'-Ende eine bessere Bindung an die mit sCD40L gekoppelten Dynabeads® M450-Epoxy (Invitrogen™) (25 %), als das Volllängen-Aptamer mit der Biotinylierung am 3'-Ende (13 %). Beide banden jedoch deutlich schlechter als die Positivkontrolle mit PE-konjugiertem anti-CD40L-Antikörper (98 %). Die verkürzte Variation des Aptamers verbesserte die Bindung an die CD40L-Kügelchen (50 %), allerdings erreichte auch sie nicht das Signal der Antikörperkontrolle. Die Verlängerung des Abstandhalters um das Doppelte (zwei HEG-Bausteine = Spacer 36) verbesserte die Bindung des Volllängen-Aptamers C10 (5'-Biotinylierung: 92 %; 3'-Biotinylierung: 99 %) sowie auch die der verkürzten Variante C10-28 (3'- und 5'-Biotinylierung: 100 %) an die mit sCD40L gekoppelten Dynabeads® M450-Epoxy sehr deutlich. Die Unterschiede zwischen 3'- und 5'-Biotinylierung schienen sich bei der Verwendung des längeren Abstandhalters aufzuheben. Alle Aptamer-Varianten mit dem Spacer 36 entsprachen in ihrem Bindungsverhalten dem der Positivkontrolle mit PE-konjugiertem anti-CD40L-Antikörper.



**Abb. 4.14: Durchflusszytometrische Bindungsanalyse verschiedener Variationen des CD40L-spezifischen DNS-Aptamers C10 auf über 18 h mit PMA / Ionomycin stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen.** CD4<sup>+</sup> T-Zellen eines freiwilligen gesunden Spenders wurden isoliert, über 18 h mit PMA / Ionomycin stimuliert und mit einem anti-CD40L-Antikörper (a) sowie mit biotinylierten CD40L-Aptameren (b) abgefragt, die über PE-fluoreszenzmarkiertes Streptavidin tetramersiert worden waren. Es kamen sowohl das Volllängen-Aptamer C10 als auch die am 3'-Ende um 28 Basen verkürzte Sequenz C10-28 zum Einsatz. Die Biotinylierung war am 3'- oder 5'-Ende des Aptamers mit einem oder zwei HEG-Bausteinen (Spacer 18 oder Spacer 36) als Abstandhalter angebracht. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Form von Histogrammen dargestellt.

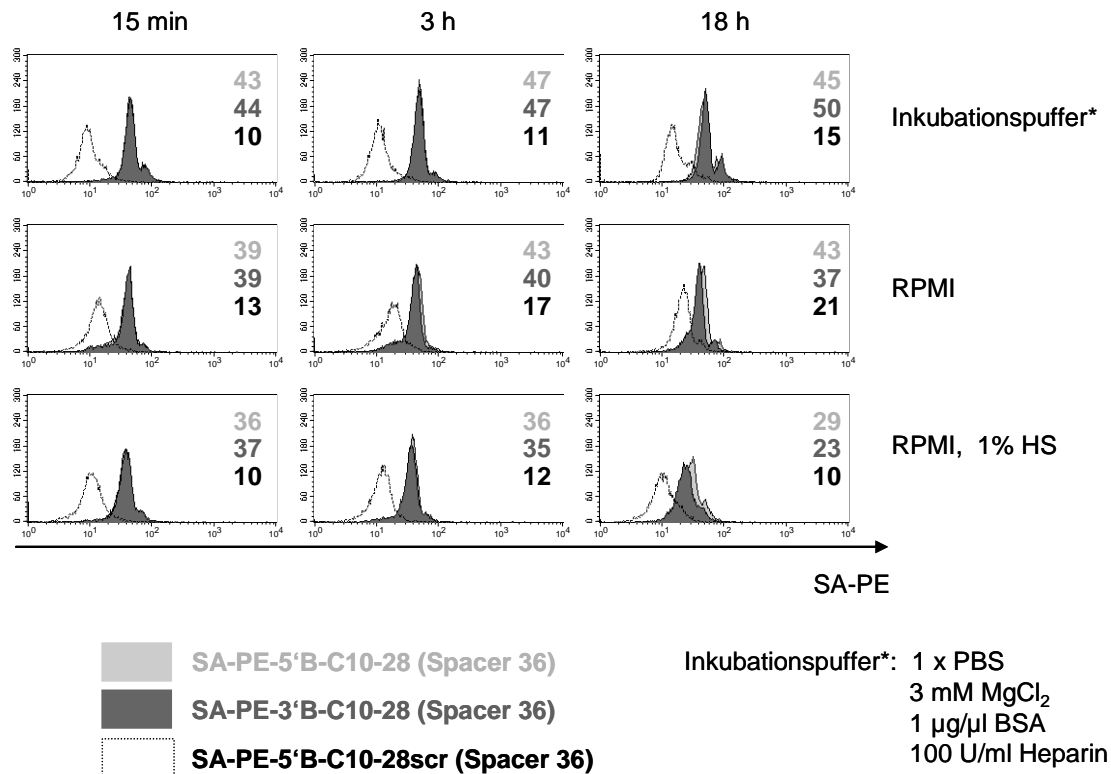
Die Bindungsanalysen der verschiedenen Aptamer-Varianten an CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die über 18 h mit PMA / Ionomycin stimuliert worden waren, ergaben ein vergleichbares Muster wie bei der Bindung an, mit sCD40L gekoppelten, Dynabeads<sup>®</sup> M450-Epoxy (Invitrogen<sup>™</sup>). Bei den Aptameren mit nur einem HEG-Baustein (Spacer 18) als Abstandhalter zwischen Biotin und Sequenz war die Bindung des Volllängen-Aptamers mit der Biotinylierung am 5'-Ende an die stimulierten T-Zellen (39 %) besser, als die des Volllängen-Aptamer mit der Biotinylierung am 3'-Ende (21 %). Beide banden jedoch deutlich schlechter als die Positivkontrolle mit PE-konjugiertem anti-CD40L-Antikörper (85 %). Die verkürzte Variation des Aptamers verbesserte die Bindung an die T-Zellen (51 %). Durch Verlängerung des Abstandhalters um das Doppelte (zwei HEG-Bausteine = Spacer 36) konnte die Bindung des Volllängen-Aptamers C10 (5'-Biotinylierung: 49 %; 3'-Biotinylierung: 40 %), wie auch die der verkürzten Variante C10-28 (5'-Biotinylierung: 54 %; 3'-Biotinylierung: 58 %), an die mit PMA / Ionomycin stimulierten T-Zellen deutlich gesteigert werden. Die Unterschiede zwischen 3'- und 5'-Biotinylierung schienen sich bei der Verwendung des längeren Abstandhalters im Fall des Volllängen-Aptamers zu verringern und bei der verkürzten Variante aufzuheben. Allerdings war zu beobachten, dass keine der Aptamer-Variationen das Ergebnis der Positivkontrolle mit PE-konjugiertem anti-CD40L-Antikörper (85 %) erreichte.

## 4.2.2 Stabilität der DNS-Aptamerbindung über die Zeit

Bereits in Filterbindungsanalysen konnte gezeigt werden, dass die Bindung der DNS-Aptamere an sCD40L auch in RPMI mit 1 % Humanserum über 24 h stabil zu sein scheint (siehe 4.1.2). Mittels Durchflusszytometrie sollten diese Ergebnisse einerseits bestätigt werden, andererseits sollte genauer untersucht werden, welche Faktoren einen Einfluss auf die Stabilität der CD40L-spezifischen DNS-Aptamere über einen Zeitraum von 18 h haben.

### 4.2.2.1 Einfluss des Humanserum-Anteils

Im Hinblick auf den möglichen Einsatz von DNS-Aptameren als Therapeutikum war es besonders wichtig, den Einfluss von Humanserum im Bindungsansatz noch einmal zu untersuchen. Dafür wurden Dynabeads® M450-Epoxy (Invitrogen™) mit löslichem CD40L (PeproTech) gekoppelt (siehe 3.1.10). Vorangegangene Bindungsanalysen verschiedener C10-Varianten hatten ergeben, dass das am 3'-Ende um 28 Basen verkürzte Aptamer C10-28 in Kombination mit dem langen Abstandhalter Spacer 36 (zwei HEG-Bausteine) die besten Bindungseigenschaften liefert (siehe 4.2.1.2). Im humanen Serum kommen sowohl Nukleasen mit 3'- als auch mit 5'-Aktivität vor, während die Aktivität von Endonukleasen zu vernachlässigen ist (Holt et al., 1988). Daher wurde die verkürzte Aptamer-Variation mit langem Abstandhalter (Spacer 36) sowohl mit Biotinylierung am 3'- als auch am 5'-Ende zur Herstellung von Tetrameren über PE-konjugiertes Streptavidin (SA-PE, Invitrogen™) verwendet (siehe 3.1.11.1) (SA-PE-3'B-C10-28 und SA-PE-5'B-C10-28, siehe Tabelle 4.3). Als Kontrollsequenz wurde SA-PE-5'B-C10-28scr verwendet (siehe Tabelle 4.3). Die Synthese der verwendeten Aptamere wurde von Metabion durchgeführt. Der Ansatz erfolgte, wie unter 3.3.3.2 beschrieben, in einem Gesamt-Volumen von 100 µl Inkubationspuffer (siehe 2.8), RPMI und RPMI mit 1 % Humanserum. RPMI wurde in beiden Fällen, wie die Medien für die Zellkultur frisch isolierter Zellen, mit 1 % L-Glutamin und 1 % Pen/Strep versetzt. Die Bindungsansätze wurden für 15 min, 3 h und 18 h bei 37 °C inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 4.15 in Form von Histogrammen dargestellt. Zusätzlich sind die Werte der jeweiligen MFI (mediane Fluoreszenzintensität) in den Diagrammen angegeben.



**Abb. 4.15: Durchflusszytometrische Untersuchung des Einflusses von Humanserum auf die Bindung von über Streptavidin tetramerisierten Biotin-Aptameren an sCD40L-gekoppelte Dynabeads® M450-Epoxy.** Dynabeads® M450-Epoxy (Invitrogen™) wurden mit sCD40L gekoppelt. Das CD40L-DNS-Aptamer C10-28 (am 5'- oder 3'-Ende biotinyliert, 36 Spacer, hellgrau bzw. dunkelgrau) wurde über PE-konjugiertes Streptavidin (SA-PE) tetramerisiert. Als Kontrolle wurde C10-28scr (durchgemischte Sequenz des Aptamers C10-28, schwarz) verwendet. Der Bindungsansatz wurde in Inkubationspuffer, RPMI (+ 1 % L-Glutamin und 1 % Pen/Strep) und RPMI mit 1 % Humanserum (HS) (+ 1 % L-Glutamin und 1 % Pen/Strep) angesetzt und für 15 min, 3 h und 18 h bei 37 °C inkubiert. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse in Form von Histogrammen. Die jeweilige MFI (mediane Fluoreszenzintensität) ist als Zahlenwert im Diagramm angegeben.

Die Daten bestätigten die Beobachtungen, die aus Filterbindungsanalysen hervorgingen (siehe 4.1.2). So war auch die Bindung der tetramerisierten Aptamere an die CD40L-Kügelchen über den gesamten Untersuchungszeitraum im Inkubationspuffer und größtenteils auch in RPMI stabil. Durch die Anwesenheit von 1 % Humanserum in RPMI veränderten sich die Ergebnisse über die Zeit leicht. Die MFI-Werte waren schon nach 3 h, noch deutlicher nach 18 h in RPMI mit 1 % HS, niedriger als in RPMI oder Inkubationspuffer. Es wurde beobachtet, dass die unspezifische Bindung der Kontrollsequenz SA-PE-5'B-C10-28scr in Anwesenheit von Medium im zeitlichen Verlauf zunahm (MFI 15 min: 13; 3 h: 17; 18 h: 21). Dieser Effekt war in Anwesenheit von 1 % HS nicht zu beobachten. Außerdem war nach 18 h Inkubation in Medium (mit und ohne Humanserum) zu erahnen, dass die Bindung des Aptamers mit der Biotinylierung am 3'-Ende (dunkelgrau), im Vergleich zur Bindung des 5'-biotinylierten Aptamers (hellgrau), leicht nachließ.

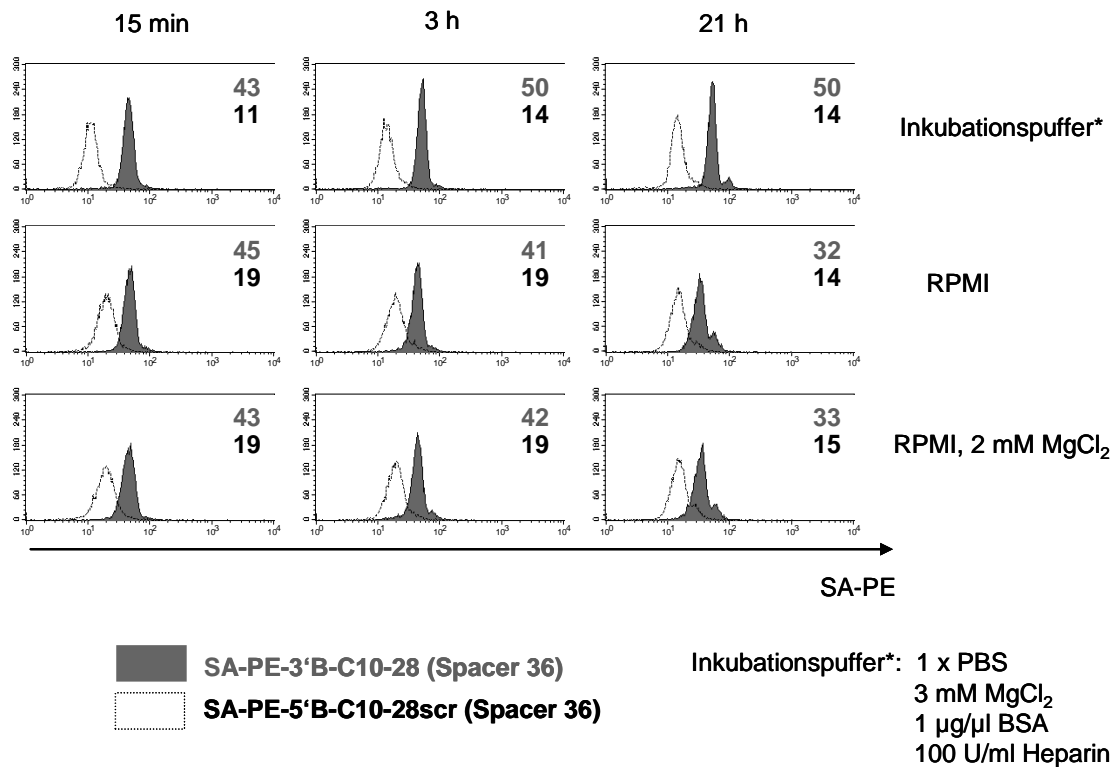


#### 4.2.2.2 Einfluss der Magnesiumchlorid-Konzentration

Aptamere haben in Lösung einen hohen Grad an molekularer Starrheit, indem zusätzlich bivalente Kationen mit der Fähigkeit eingelagert werden, Guaninbasen und Phosphatgruppen miteinander zu verknüpfen. Während der Selektion und den Bindungsanalysen wurden deshalb 3 mM  $\text{MgCl}_2$  eingesetzt. In RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen<sup>TM</sup>), das im Rahmen dieser Arbeit für alle zellbasierten Versuche verwendet wurde, sind zweiwertige Kationen in Form von Kalziumnitrat ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,424 mM) und Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,407 mM) enthalten.

Im nächsten Schritt sollte daher untersucht werden, ob die zusätzliche Gabe von  $\text{MgCl}_2$  (final 2 mM) die Bindung an mit sCD40L (PeproTech) gekoppelte Dynabeads<sup>®</sup> M450-Epoxy (Invitrogen<sup>TM</sup>) (siehe 3.1.10) verbessert, da  $\text{MgCl}_2$  die dreidimensionale Struktur der Aptamere stabilisiert. Für den Versuch wurde das verkürzte Aptamer C10-28 über PE-fluoreszenzmarkiertes Streptavidin (SA-PE, Invitrogen<sup>TM</sup>) tetramerisiert (siehe 3.1.11.1) (SA-PE-3'B-C10-28 (Spacer 36), siehe Tabelle 4.3). Als Kontrollsequenz wurde C10-28scr verwendet (SA-PE-5'B-C10-28scr (Spacer 36), siehe Tabelle 4.3). Die Synthese der verwendeten Aptamere wurde von Metabion durchgeführt. Der Ansatz erfolgte, wie unter 3.3.3.2 beschrieben, in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  Inkubationspuffer (siehe 2.8), RPMI und RPMI mit zusätzlich 2 mM  $\text{MgCl}_2$ . RPMI wurde in beiden Fällen in Analogie zu dem Medium für die Zellkultur frisch isolierter Zellen mit 1 % Humanserum, 1 % L-Glutamin und 1 % Pen/Strep versetzt. Die Bindungsansätze wurden für 15 min, 3 h und 21 h bei 37 °C inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht.

Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 4.16 in Form von Histogrammen und der Angabe der jeweiligen MFI zusammengefasst. Es ist deutlich zu sehen, dass die Zugabe von Magnesiumchlorid in den Bindungsansatz mit RPMI (versetzt mit 1 % HS, 1 % L-Glutamin und 1 % Pen/Strep) das Bindungsverhalten des tetramerisierten Aptamers SA-PE-3'B-C10-28 (Spacer 36), verglichen mit dem der Kontrollsequenz SA-PE-5'B-C10-28scr (Spacer 36), weder verbesserte noch veränderte. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die im RPMI-Medium enthaltenen bivalenten Kationen ausreichen, um die dreidimensionale Struktur der Aptamere zu stabilisieren. Auch hier konnte beobachtet werden, dass die unspezifische Bindung des Kontrollaptamers SA-PE-5'B-C10-28scr in Anwesenheit von Medium höher war als im Inkubationspuffer.



**Abb. 4.16: Durchflusszytometrische Untersuchung des Einflusses von MgCl<sub>2</sub> auf die Bindung von über Streptavidin tetramerisierten Biotin-Aptameren an sCD40L-gekoppelte Dynabeads® M450-Epoxy.** Dynabeads® M450-Epoxy (Invitrogen™) wurden mit sCD40L gekoppelt. Das CD40L-DNS-Aptamer C10-28 (am 3'-Ende biotinyliert, 36 Spacer, dunkelgrau) wurde über PE-konjugiertes Streptavidin (SA-PE) tetramerisiert. Als Kontrolle wurde C10-28scr (durchgemischte Sequenz des Aptamers C10-28, schwarz) verwendet. Der Bindungsansatz wurde in Inkubationspuffer, RPMI (+ 1 % HS, 1 % L-Glutamin und 1 % Pen/Strep) und RPMI mit zusätzlich 2 mM MgCl<sub>2</sub> (+ 1 % HS, 1 % L-Glutamin und 1 % Pen/Strep) angesetzt und für 15 min, 3 h und 21 h bei 37 °C inkubiert. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse in Form von Histogrammen. Die jeweilige MFI ist als Zahlenwert im Diagramm angegeben.

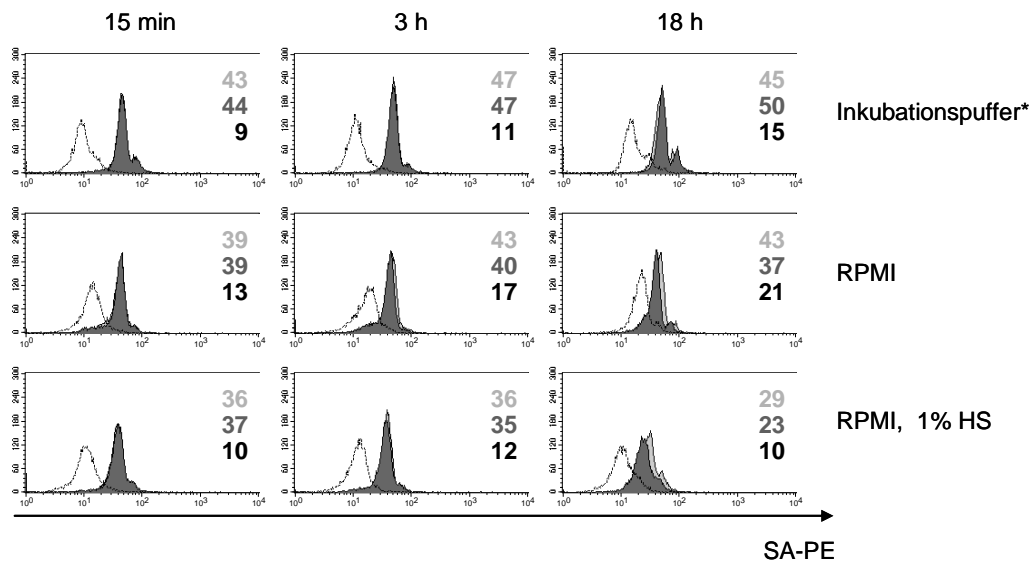
#### 4.2.2.3 Stabilität der DNS-Aptamere in An- und Abwesenheit des Zielproteins

Wie unter 4.2.2.1 beschrieben zeigte sich, dass Humanserum in der eingesetzten Konzentration kaum einen Einfluss auf die Stabilität der Bindung der tetramerisierten CD40L-spezifischen DNS-Aptamere an mit sCD40L gekoppelte Dynabeads® M450-Epoxy (Invitrogen™) hatte. Allerdings war ein leichter Unterschied im Bindungsverhalten des Aptamers, je nach Orientierung der Biotinylierung (5'- oder 3'-Ende), nach 18 h Inkubation in Medium beobachtet worden. Es sollte daher untersucht werden, ob die An- oder Abwesenheit des Zielproteins einen Einfluss auf die Stabilität der Aptamere hat. Dafür wurden Dynabeads® M450-Epoxy (Invitrogen™) mit löslichem

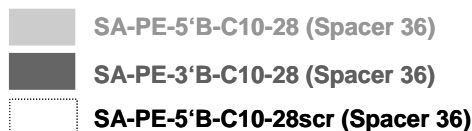
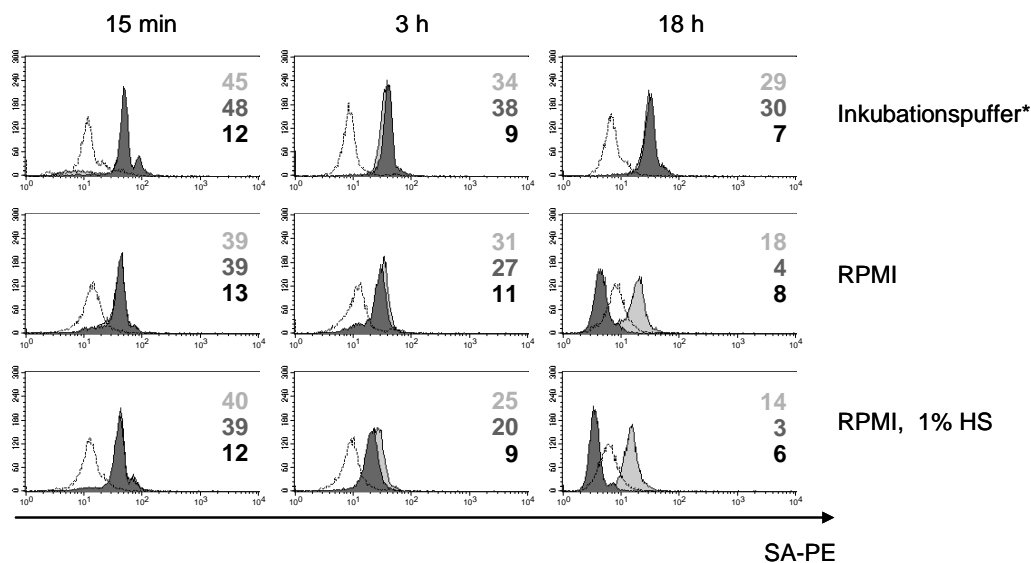
CD40L (PeproTech) gekoppelt (siehe 3.1.10). Die verkürzte Aptamer-Variation mit langem Abstandhalter (Spacer 36) wurde mit Biotinylierung sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende zur Herstellung von Tetrameren über PE-konjugiertes Streptavidin (SA-PE, Invitrogen™) verwendet (siehe 3.1.11.1) (SA-PE-3'B-C10-28 und SA-PE-5'B-C10-28). Als Kontrolle kam, wie gewohnt, C10-28scr zum Einsatz, das aus der durcheinander gewürfelten Sequenz des Aptamers C10-28 besteht (SA-PE-5'B-C10-28scr). Die Synthese der verwendeten Aptamere wurde von Metabion durchgeführt. Der Bindungsansatz erfolgte, wie unter 3.3.3.2 beschrieben, in einem Gesamt-Volumen von 100 µl Inkubationspuffer (siehe 2.8), RPMI und RPMI mit 1 % Humanserum. RPMI wurde in beiden Fällen, wie die Medien für die Zellkultur frisch isolierter Zellen, mit 1 % L-Glutamin sowie 1 % Pen/Strep versetzt. In diesem Fall wurden die CD40L-Kügelchen einerseits, wie gewohnt, zu Beginn der Inkubation zugegeben (Zielprotein anwesend), andererseits erst 15 min vor Ende des jeweiligen Inkubationszeitraums (Zielprotein während Inkubation größtenteils abwesend). Die Bindungsansätze wurden für 15 min, 3 h und 18 h bei 37 °C inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht.

In Abbildung 4.17 sind die Ergebnisse in Form von Histogrammen dargestellt. Die Daten der Bindungsansätze, in denen die mit sCD40L gekoppelten Dynabeads® M450-Epoxy zu Beginn der Inkubation zugegeben wurden, bestätigen die Daten aus 4.2.2.1. Im direkten Vergleich dieser Ergebnisse mit den Daten der Bindungsansätze, in die die CD40L-Kügelchen erst 15 min vor Ende der jeweiligen Inkubationszeit zugegeben wurden, sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Schon nach 3 h war zu erahnen, was nach 18 h eindeutig war: In Abwesenheit des Zielproteins während der Inkubation nahm die Bindung der Aptamere ab. Insbesondere die Daten der Ansätze in Medium, ohne oder mit 1 % HS, zeigen diese Bindungsabnahme über die Zeit sehr deutlich. Dabei schien die Biotinylierung am 3'-Ende (dunkelgrau) zusätzlich eine starke Verringerung des Bindungssignals hervorzurufen. Die Bindung des Aptamers an die Zielstruktur (CD40L-Protein) schützte offensichtlich vor Degradation durch Nukleasen und verbesserte so die Stabilität des Aptamers um Stunden.

## (a) Zugabe der mit sCD40L gekoppelten Dynabeads® M450-Epoxy zu Beginn der Inkubation



## (b) Zugabe der mit sCD40L gekoppelten Dynabeads® M450-Epoxy 15 min vor Inkubationsende



Inkubationspuffer\*: 1 x PBS  
3 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 µg/µl BSA  
100 U/ml Heparin

**Abb. 4.17: Durchflusszytometrische Untersuchung des Einflusses von An- (a) und Abwesenheit (b) des Zielproteins auf die Stabilität der über Streptavidin tetramerisierten CD40L-spezifischen DNS-Aptamere.** Das CD40L-DNS-Aptamer C10-28 (am 5'- oder 3'-Ende biotinyliert, 36 Spacer, hellgrau bzw. dunkelgrau) wurde über PE-konjugiertes Streptavidin (SA-PE) tetramerisiert. Als Kontrolle wurde C10-28scr (durchgemischte Sequenz des Aptamers C10-28, schwarz) verwendet. Der Bindungsansatz wurde in Inkubationspuffer, in RPMI (mit 1 % L-Glutamin und 1 % Pen/Strep) und in RPMI mit 1 % Humanserum (HS) (mit 1 % L-Glutamin und 1 % Pen/Strep) angesetzt und für 15 min, 3 h und 18 h bei 37 °C inkubiert. Dabei wurden die mit sCD40L (PeproTech) gekoppelten Dynabeads® M450-Epoxy (Invitrogen™) zu einem, wie gewöhnlich, zu Beginn der Inkubation (a) und zum anderen erst 15 min vor Ende des Inkubationszeitraums zugegeben (b). Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse in Form von Histogrammen. Die jeweilige MFI ist als Zahlenwert im Diagramm angegeben.

### **4.2.3 Bindung von tetramerisierten Aptameren an CD40L auf der Oberfläche stimulierter T-Zellen**

Die Untersuchungen der verschiedenen Variationen des CD40L-spezifischen DNS-Aptamers S51A-C10 zeigten, dass sich je nach Orientierung der Biotinylierung (am 3'- oder 5'-Ende des Aptamers) und je nach Länge des Abstandhalters zwischen Biotin und Aptamersequenz (Spacer 18 und Spacer 36) deutliche Unterschiede im Bindungsverhalten ergeben (siehe 4.2.1.2). Es wurde bereits erfolgreich gezeigt, dass die verkürzte, über Streptavidin tetramerisierte, Variante des Aptamers C10 CD40L auf der Oberfläche über PMA / Ionomycin stimulierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen bindet (siehe Abbildung 4.15). Allerdings waren die Bindungssignale nicht mit denen der Antikörperkontrolle vergleichbar. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob das Bindungssignal des verkürzten Aptamers (C10-28, 3'- und 5'-Biotinylierung) von der Art der T-Zell-Stimulation abhängig ist. Ferner sollte die CD40L-Expression auf der T-Zelllinie Jurkat (Humane T-Zell-Lymphom-Zelllinie) mithilfe des tetramerisierten Aptamers abgefragt werden.

#### **4.2.3.1 Bindungssignal in Abhängigkeit der Stimulations-Art**

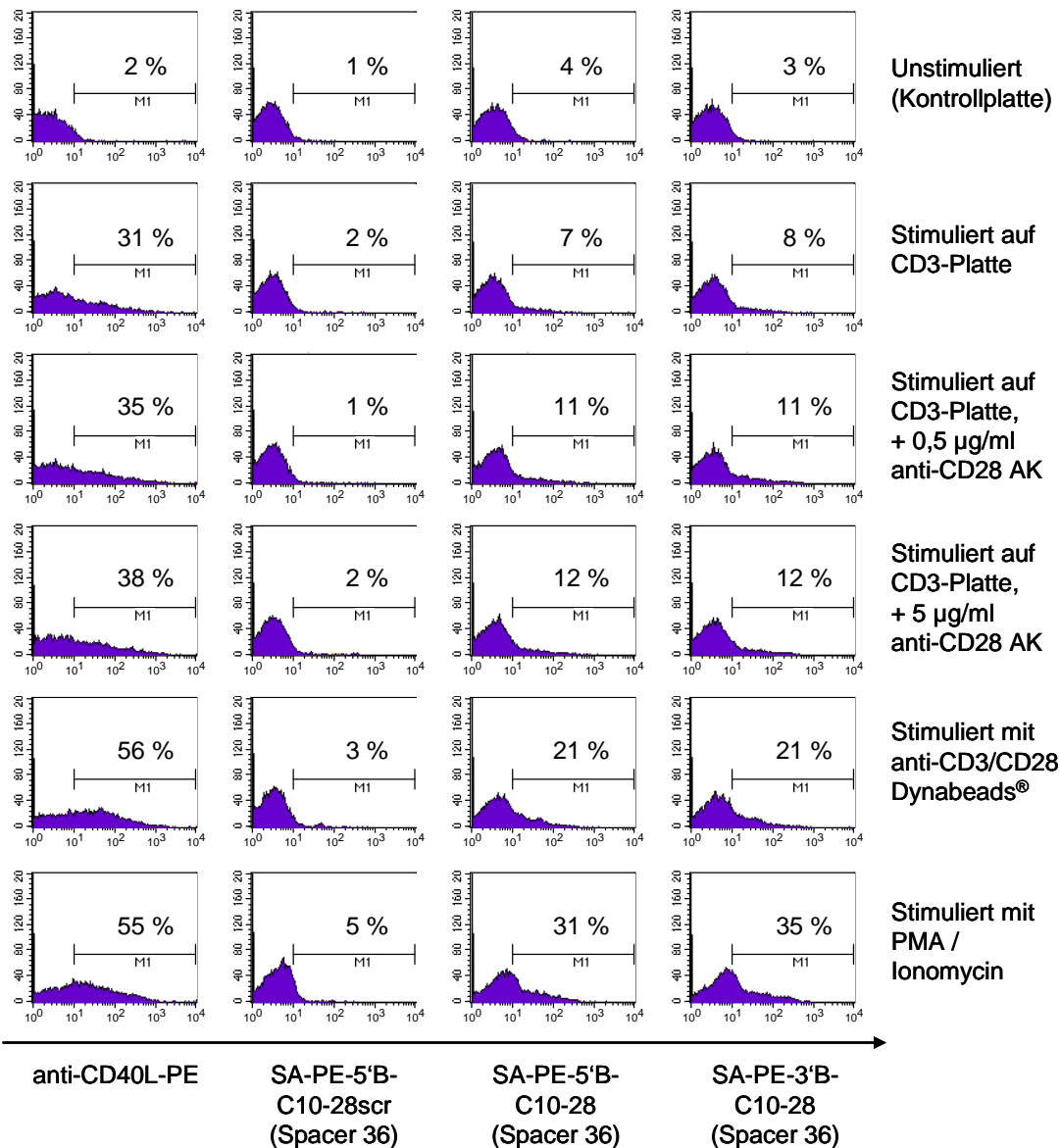
Als effektivster Weg für eine schnelle und maximale CD40L-Expression auf T-Lymphozyten ist die TCR-unabhängige in vitro Stimulation mit Ionomycin in Kombination mit PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat) bekannt. Ionomycin bewirkt einen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, was zur Einleitung der Gentranskription und Akkumulation von CD40L-mRNS führt. Durch die Kostimulation mit PMA wird die CD40L-Genexpression über die Aktivierung der Protein-Kinase C (PKC) erhöht und verlängert (Nüsslein et al., 1996; Suarez et al., 1997). Eine weitere Methode zur in vitro Stimulation von T-Lymphozyten und somit zur Aufregulation von CD40L erfolgt über Dynabeads<sup>®</sup> CD3/CD28 (Invitrogen<sup>™</sup>). Die Polystyren-Kügelchen sind mit einer optimierten Mischung aus monoklonalen Antikörpern gegen CD3 und CD28 humaner T-Zellen beschichtet. Durch die Bindung des CD3-Antikörpers an die  $\epsilon$ -Kette des CD3-Antigens (Untereinheit des T-Zell-Rezeptors) und die Bindung des CD28-Antikörpers an das kostimulatorische CD28-Molekül (Rezeptor für CD80 und CD86) wird die in vivo T-Zell-Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen imitiert. Eine sehr ähnliche Methode zur in vitro Stimulation von T-Zellen erfolgt über Zellkulturplatten, die mit einem anti-CD3-Antikörper beschichtet sind (T-Cell Activation 96-well Assay Plates, Anti-Human CD3, von BD Biosciences). Die Stimulation kann

durch den zusätzlichen Einsatz eines anti-CD28-Antikörpers unterstützt werden, der eine Kostimulation imitiert (Mouse Anti-Human CD28, purified NA/LE, von BD Biosciences).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die drei beschriebenen Methoden hinsichtlich ihres Potentials zur Aufregulation von CD40L untersucht werden. Die Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Aufreinigung und Isolation über Dichtegradienten-Zentrifugation (siehe 3.2.1) und Magnet-assoziierte Zellseparation (siehe 3.2.2.1)) wurde, wie unter 3.2.5.1 (PMA / Ionomycin), 3.2.5.2 (Dynabeads<sup>®</sup> CD3/CD28) und 3.2.5.3 (anti-CD3 beschichtete Platten) beschrieben, durchgeführt. Die CD40L-Expression sollte im zeitlichen Verlauf (nach 23 und 47 h) unter der Verwendung des Aptamers C10-28 beobachtet werden. Die verkürzte Aptamer-Variation mit langem Abstandhalter (Spacer 36) wurde dafür sowohl mit Biotinylierung am 3'- als auch am 5'-Ende zur Herstellung von Tetrameren über PE-konjugiertes Streptavidin (SA-PE, Invitrogen<sup>™</sup>) verwendet (siehe 3.1.11.1) (SA-PE-3'B-C10-28 und SA-PE-5'B-C10-28 (Spacer 36), siehe Tabelle 4.3). Als Kontrolle kam, wie gewohnt, C10-28scr zum Einsatz, das aus der durcheinander gewürfelten Sequenz des Aptamers C10-28 besteht (SA-PE-5'B-C10-28scr). Die Synthese der verwendeten Aptamere wurde von Metabion durchgeführt. Der Bindungsansatz erfolgte, wie unter 3.3.3.2 beschrieben, in einem Gesamt-Volumen von 100 µl Inkubationspuffer (siehe 2.8). Zur Kontrolle wurde zusätzlich auch der PE-konjugierte anti-CD40L-Antikörper (BD Pharmingen<sup>™</sup>) verwendet (Markierung siehe 3.3.2). Als Negativkontrolle wurden unstimulierte Zellen verwendet. Um die Grenze zwischen positivem und negativem Signal zu setzen, wurde eine Messung mit einer PE-konjugierten Isotypkontrolle durchgeführt (siehe 3.3.2).

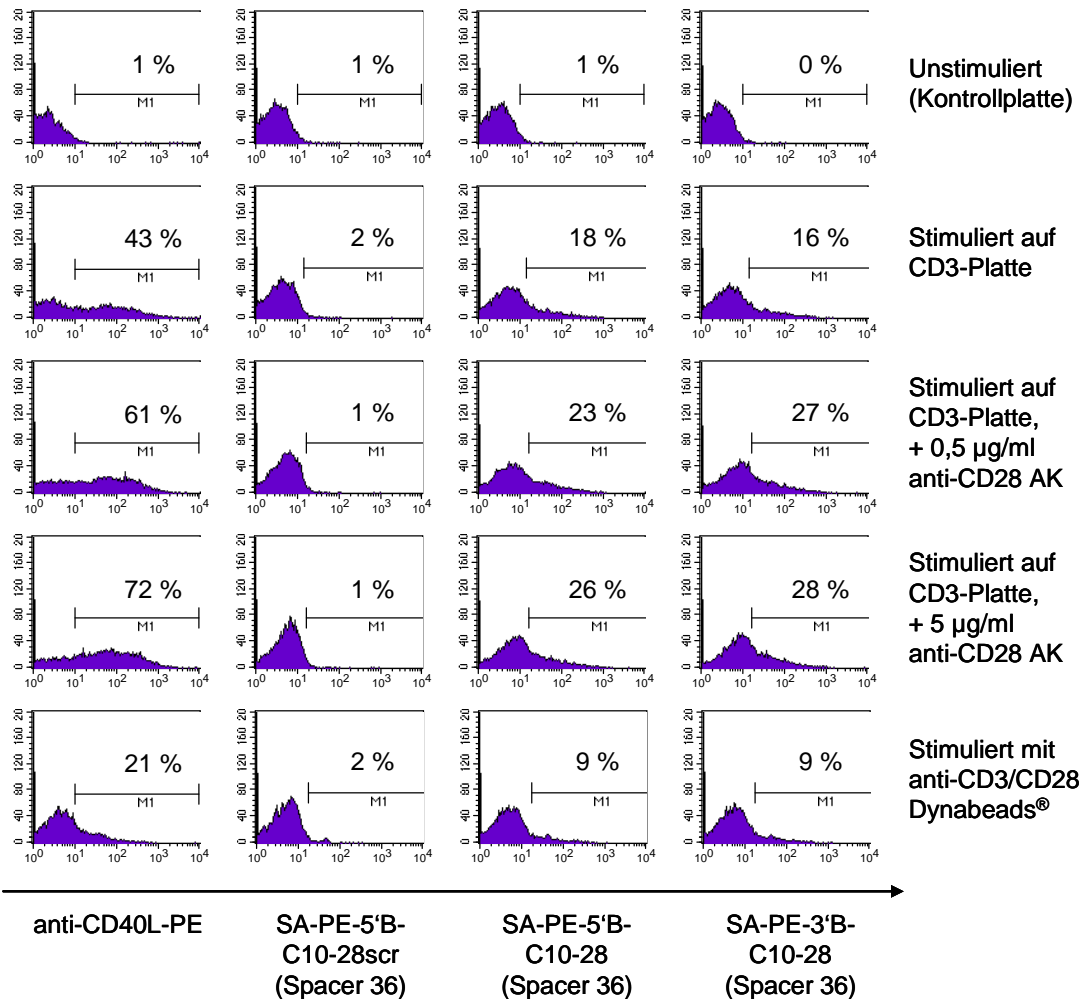
Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen sind in den Abbildungen 4.18 (23 h) und 4.19 (47 h) in Form von Histogrammen dargestellt. Die Negativkontrolle mit unstimulierten Zellen ergab erwartungsgemäß weder nach 23 h noch nach 47 h ein positives Signal mit dem anti-CD40L-Antikörper (1 - 2 %). Auch das Signal der Kontrolle mit der unspezifischen Sequenz C10-28scr war in keinem Fall über 5 %. Die Stimulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mithilfe der anti-CD3 beschichteten Zellkulturplatten und steigenden Konzentrationen an anti-CD28-Antikörper erreichte die beste Aufregulation der CD40L-Expression nach 47 h und unter der Verwendung von 5 µg/ml anti-CD28-Antikörper (72 % mit anti-CD40L-Antikörper). Die beiden verkürzten Aptamer-Varianten C10-28 (3'- und 5'-Biotinylierung) zeigten hier jeweils vergleichbare Ergebnisse, die allerdings nur 30 bis 40 % des Antikörpersignals entsprachen.

## Inkubation für 23 h



**Abb. 4.18:** Durchflusszytometrische Bindungsanalyse des verkürzten CD40L-spezifischen DNS-Aptamers C10-28 an CD40L auf der Oberfläche unterschiedlich stimulierter humaner CD4<sup>+</sup> T-Zellen (23 h). CD4<sup>+</sup> T-Zellen eines freiwilligen gesunden Spenders wurden isoliert und über 23 h auf verschiedene Weise zur Aufregulation der CD40L-Expression stimuliert. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte Zellen verwendet (erste Zeile). Die Stimulation erfolgte einerseits über anti-CD3 beschichtete Platten mit steigenden Konzentrationen an anti-CD28-Antikörper (Zeile 2: 0 µg/ml anti-CD28 AK; Zeile 3: 0,5 µg/ml anti-CD28 AK; Zeile 4: 5 µg/ml anti-CD28 AK). Außerdem wurden die Zellen mit anti-CD3/CD28 Dynabeads® (Zeile 5) und mit PMA / Ionomycin (Zeile 6) stimuliert. Die CD40L-Expression wurde mit einem anti-CD40L-Antikörper gemessen (Spalte 1). Außerdem wurde die CD40L-Expression mit über PE-fluoreszenzmarkiertem Streptavidin tetramersierten Variationen des verkürzten DNS-Aptamers C10-28 abgefragt (Spalte 2: unspezifische Sequenz 5'B-C10-28scr; Spalte 3: 5'-biotinyliertes verkürztes Aptamer 5'B-C10-28; Spalte 4: 3'-biotinyliertes verkürztes Aptamer 3'B-C10-28). Alle drei Aptamere hatten zwei HEG-Bausteine (Spacer 36) als Abstandhalter zwischen Sequenz und Biotinylierung. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse nach 23 h Stimulation sind in Form von Histogrammen dargestellt. Die Grenze zwischen positivem und negativem Signal wurde durch eine Messung mit einer PE-konjugierten Isotypkontrolle gesetzt.

## Inkubation für 47 h



**Abb. 4.19: Durchflusszytometrische Bindungsanalyse des verkürzten CD40L-spezifischen DNS-Aptamers C10-28 an CD40L auf der Oberfläche unterschiedlich stimulierter humaner CD4<sup>+</sup> T-Zellen (47 h).** CD4<sup>+</sup> T-Zellen eines freiwilligen gesunden Spenders wurden isoliert und über 47 h auf verschiedene Weise zur Aufregulation der CD40L-Expression stimuliert. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte Zellen verwendet (erste Zeile). Die Stimulation erfolgte einerseits über anti-CD3 beschichtete Platten mit steigenden Konzentrationen an anti-CD28-Antikörper (Zeile 2: 0 µg/ml anti-CD28 AK; Zeile 3: 0,5 µg/ml anti-CD28 AK; Zeile 4: 5 µg/ml anti-CD28 AK) und andererseits mit anti-CD3/CD28 Dynabeads® (Zeile 5). Die CD40L-Expression wurde mit einem anti-CD40L-Antikörper gemessen (Spalte 1). Außerdem wurde die CD40L-Expression mit über PE-fluoreszenz-markiertem Streptavidin tetramerisierten Variationen des verkürzten DNS-Aptamers C10-28 abgefragt (Spalte 2: unspezifische Sequenz 5'B-C10-28scr; Spalte 3: 5'-biotinyliertes verkürztes Aptamer 5'B-C10-28; Spalte 4: 3'-biotinyliertes verkürztes Aptamer 3'B-C10-28). Alle drei Aptamere hatten zwei HEG-Bausteine (Spacer 36) als Abstandhalter zwischen Sequenz und Biotinylierung. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse nach 47 h Stimulation sind in Form von Histogrammen dargestellt. Die Grenze zwischen positivem und negativem Signal wurde durch eine Messung mit einer PE-konjugierten Isotypkontrolle gesetzt.

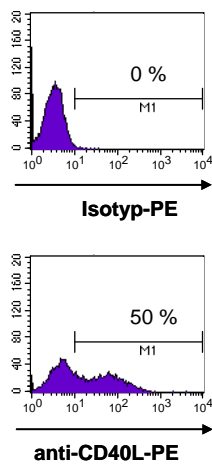
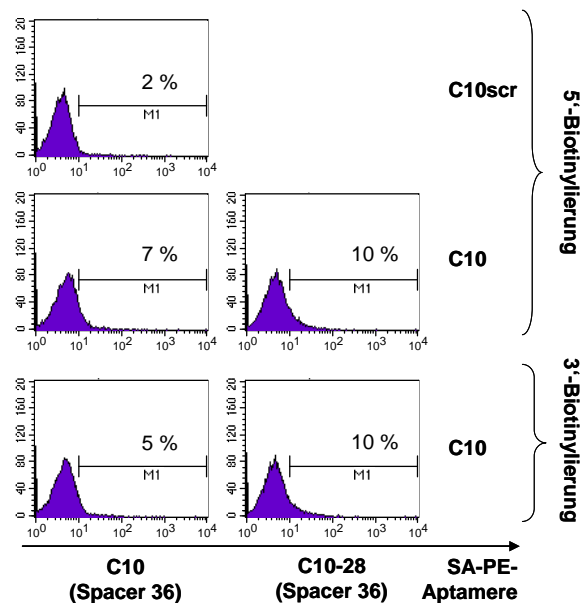
Bei der Verwendung der Dynabeads® CD3/CD28 (Invitrogen™) wurde nach 23 h Stimulation eine höhere CD40L-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet (56 % mit anti-CD40L-Antikörper) als nach 47 h (21 % mit anti-CD40L-Antikörper). Auch hier konnte eine untereinander vergleichbare Bindung der beiden Varianten des verkürzten



Aptamers C10-28 (3'- und 5'-Biotinylierung) an die stimulierten Zellen nachgewiesen werden. Wie bei den auf anti-CD3 beschichteten Platten stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen entsprachen diese Ergebnisse aber nur etwa 40 % des entsprechenden Antikörpersignals. Die Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit PMA / Ionomycin ergab schon in vorhergehenden Versuchen eine optimale CD40L-Expression nach 18 h (85 % mit anti-CD40L-Antikörper, siehe Abbildung 4.14). Schon nach 23 h nimmt die CD40L-Expression auf der Oberfläche der stimulierten T-Zellen deutlich ab (55 % mit anti-CD40L-Antikörper, Abbildung 4.18). Werte nach 47 h wurden deshalb für diese Stimulationsart nicht erhoben. Verglichen mit den Werten, die sich mithilfe des anti-CD40L-Antikörpers ergaben, waren die Werte des verkürzten Aptamers, wie schon in den vorangegangenen Versuchen, geringer. Allerdings erreichten die Aptamersignale hier mit knapp zwei Drittel des Antikörpersignals das beste Ergebnis im Vergleich zu den anderen Stimulationsmethoden. Die Art der Stimulation beeinflusste somit nicht nur den zeitlichen Verlauf sowie die Dichte der CD40L-Expression, sondern auch das Bindungsverhalten des Aptamers.

#### **4.2.3.2 Bindungssignal auf der T-Zelllinie Jurkat**

Sowohl in Filterbindungsanalysen (siehe 4.1.1), als auch in durchflusszytometrischen Bindungsstudien (siehe 4.2.3.1) wurde beobachtet, dass schon kleine strukturelle und konformelle Unterschiede des CD40L-Moleküls die Bindung der CD40L-spezifischen DNS-Aptamere beeinträchtigen können. Deshalb war es interessant, auch die T-Zelllinie Jurkat (T-Zell-Lymphom-Zelllinie) auf ihre CD40L-Expression sowie die Bindung der DNS-Aptamere zu untersuchen. Dafür wurden verschiedene biotinylierte Varianten des Aptamers C10 (Volllänge oder verkürzt) mit zwei HEG-Bausteinen (Spacer 36) als Abstandhalter zwischen Biotin und 3'- oder 5'-Ende der Aptamersequenz synthetisiert (Metabion). Als Kontrollsequenz wurde wieder C10scr verwendet. Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurden die Jurkat-Zellen, wie unter 3.3.3.2 beschrieben, mit Aptameren markiert, die über PE-konjugiertes Streptavidin (SA-PE, Invitrogen<sup>TM</sup>) tetramerisiert worden waren (siehe 3.1.11.1). Der Bindungsansatz erfolgte mit einem Gesamt-Volumen von 100 µl (hier Inkubationspuffer, siehe 2.8). Zur Unterscheidung von positivem und negativem Signal wurden auch jeweils eine Messung mit einer PE-konjugierten Isotypkontrolle sowie eine Messung mit einem PE-konjugiertem anti-CD40L-Antikörper (BD Pharmingen<sup>TM</sup>) durchgeführt (siehe 3.3.2). Abbildung 4.20 fasst die Ergebnisse in Form von Histogrammen zusammen.

**(a) Expressionskontrolle mit anti-CD40L Antikörper****(b) Expressionskontrolle mit anti-CD40L DNS-Aptameren**

**Abb. 4.20: Durchflusszytometrische Bindungsanalyse verschiedener Variationen des CD40L-spezifischen DNS-Aptamers C10 auf Jurkat-Zellen (T-Zelllinie).** Jurkat-Zellen wurden mit einem anti-CD40L-Antikörper (a) sowie mit biotinylierten CD40L-Aptameren abgefragt (b), die über PE-fluoreszenzmarkiertes Streptavidin tetramersiert worden waren. Es kamen sowohl das Volllängen-Aptamer C10 als auch die am 3'-Ende um 28 Basen verkürzte Sequenz C10-28 zum Einsatz. Die Biotinylierung war am 3'- oder 5'-Ende des Aptamers mit zwei HEG-Bausteinen (Spacer 36) als Abstandhalter angebracht. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Form von Histogrammen dargestellt.

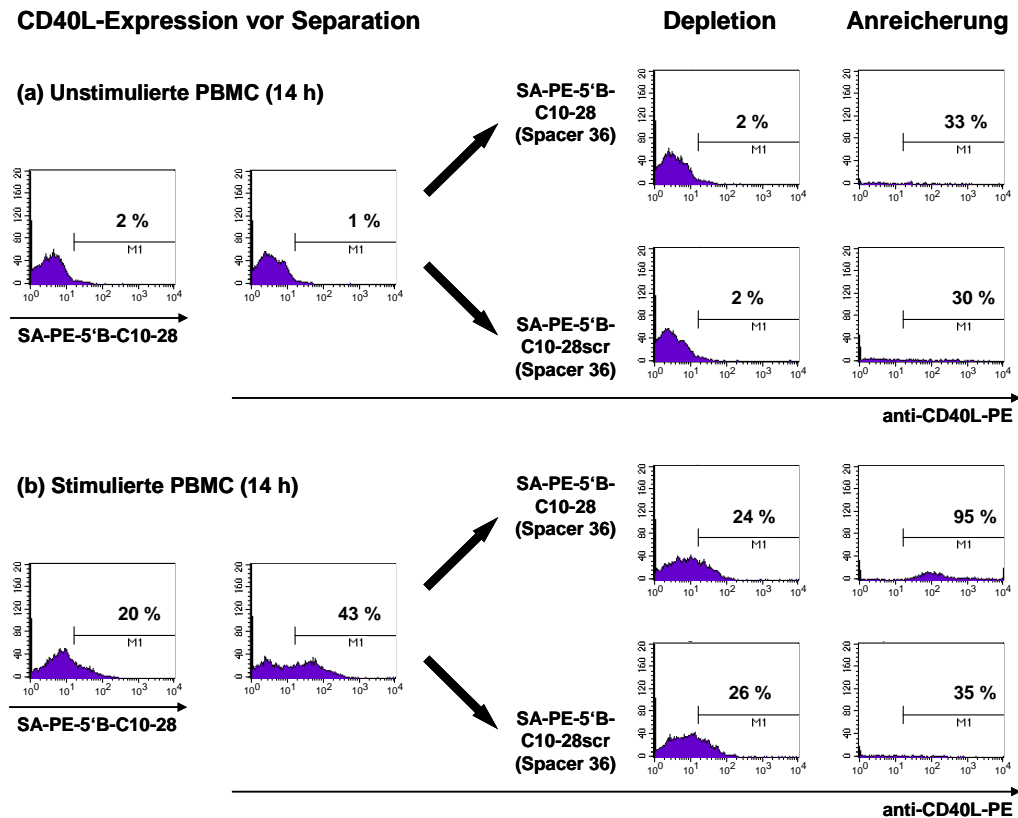
Die Bindungsanalysen der verschiedenen Aptamer-Varianten an Jurkat-Zellen ergaben ein deutlich geringeres Signal als die Kontrolle mit dem anti-CD40L-Antikörper (50 %). Das Volllängen-Aptamer C10 erreichte nur etwa ein Zehntel des Antikörpersignals (5'-Biotinylierung: 7 %; 3'-Biotinylierung: 5 %), das verkürzte Aptamer C10-28 etwa ein Fünftel des Antikörpersignals (5'- und 3'-Biotinylierung: 10 %). Es konnte somit ein weiteres Mal gezeigt werden, dass die Bindung des CD40L-DNS-Aptamers schon durch kleine strukturelle und konformelle Unterschiede des CD40L-Moleküls beeinflusst wird. Wie in vorhergehenden Experimenten (siehe 4.2.1.2) konnte außerdem beobachtet werden, dass sich bei der Verwendung des längeren Abstandhalters (Spacer 36) kaum unterschiedliche Bindungsmuster zwischen 3'- und 5'-Biotinylierung ergaben, die im Fall der verkürzten Aptamer-Variante sogar ganz aufgehoben wurden. Die unspezifische Sequenz C10scr zeigte erwartungsgemäß keine Bindung (2 %).

### **4.3 Magnet-assoziierte Zellseparation CD40L-positiver T-Zellen auf DNS-Aptamer-Basis**

Eine weitere wichtige Fragestellung dieser Arbeit war, ob sich auf der Basis von Aptameren eine Magnet-assoziierte Zellseparation durchführen lässt. Dafür wurden die in einer üblichen MACS eingesetzten Antikörper durch DNS-Aptamere ersetzt. Es wurden die bereits auf molekularer Ebene und in durchflusszytometrischen Untersuchungen charakterisierte und vielversprechende, um 28 Basen am 3'-Ende verkürzte, Variation des DNS-Aptamers S51A-C10 mit Biotinylierung am 5'-Ende und zwei HEG-Bausteinen als Abstandhalter (Spacer 36) verwendet (synthetisiert von Metabion).

Es wurden zwei verschiedene Ansätze zur positiven Selektion von CD40L<sup>+</sup> T-Zellen aus peripheren mononukleären Zellen untersucht (siehe 3.2.2.2), die über 14 h mit PMA / Ionomycin stimuliert wurden (siehe 3.2.5.1). Zum einen wurden Zellen (etwa  $5 \times 10^6$  PBMC) mit dem Aptamer-Monomer 5'B-C10-28 markiert und über Anti-Biotin-Beads (Miltenyi Biotec) separiert. Zum anderen wurden die Zellen mit dem über Streptavidin-PE (Invitrogen<sup>TM</sup>) tetramerisierten Aptamer SA-PE-5'B-C10-28 (siehe 3.1.11.1) markiert und anschließend über Anti-PE-MicroBeads (Miltenyi Biotec) getrennt. Als Negativkontrolle wurde, wie üblich, die unspezifische Kontrollsequenz 5'B-C10-28scr (Sequenz des Aptamers C10-28 über die gesamte Länge durcheinander gewürfelt) sowie unstimulierte (CD40L<sup>-</sup>) Zellen eingesetzt. Die genaue Durchführung der Aptamer-basierten Magnet-assoziierten Zellseparation ist unter 3.2.2.2 beschrieben.

Die durchflusszytometrische Analyse der Versuche zeigte, dass die Magnet-assoziierte Zellseparation auf Basis von DNS-Aptameren grundsätzlich möglich ist. Durch die Verwendung von Aptamer-Tetrameren konnte dabei eine deutlich bessere Reinheit erzielt werden, als mit Aptamer-Monomeren. Zur weiteren Verbesserung der Reinheit und auch der Ausbeute wurden weitere Schritte verändert. So wurden das Wasch- oder Elutionsvolumen erhöht und auch versucht, die biotinylierten Aptamer-Monomere zuerst mit Anti-Biotin-Beads zu multimerisieren und dann gemeinsam auf die Zellen zu gegeben. Während die vorangehende Multimerisierung der Aptamere über Anti-Biotin-Beads die Reinheit nicht verbesserte, konnte die Ausbeute durch ein größeres Elutionsvolumen etwas gesteigert werden.



**Abb. 4.21: Durchflusszytometrische Analyse der An- bzw. Abreicherung von CD40L<sup>+</sup> T-Zellen aus peripheren mononukleären Zellen mittels CD40L-spezifischer DNS-Aptamerklone.** Humane PBMC wurden über 14 h inkubiert (a) bzw. mit PMA / Ionomycin stimuliert (b) und ihre CD40L-Expression mit dem über SA-PE tetramersierten Aptamer 5'B-C10-28 sowie einem PE-konjugiertem anti-CD40L-Antikörper durchflusszytometrisch bestimmt. Anschließend folgte eine Magnet-assoziierte Zellseparation mittels über SA-PE tetramersierten CD40L-Aptameren (5'B-C10-28 und 5'B-C10-28 als Kontrolle) und anti-PE-MicroBeads. Der Erfolg der positiven Selektion von CD40L<sup>+</sup> T-Zellen aus unstimulierten (a) und stimulierten (b) PBMC wurde durchflusszytometrisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Form von Histogrammen dargestellt. Um die Grenze zwischen positivem und negativem Signal zu setzen, wurde eine Messung mit einer PE-konjugierten Isotypkontrolle durchgeführt.

Abbildung 4.21 (a) zeigt die Ergebnisse der Aptamer-basierten Magnet-assoziierten Zellseparation der unstimulierten Kontrollzellen. Die durchflusszytometrische Analyse der peripheren mononukleären Zellen vor Separation ergab erwartungsgemäß weder mit dem über SA-PE tetramersierten Aptamer 5'B-C10-28 noch mit dem PE-konjugiertem anti-CD40L-Antikörper ein positives Signal der CD40L-Expression (maximal 2 %). Dementsprechend waren die Zellen nach Depletion mit der unspezifischen Zufallssequenz sowie mit dem CD40L-Aptamer C10-28 ebenfalls nicht CD40L-positiv (2 %). Nach der Depletion konnten kaum angereicherte Zellen aus den Säulen isoliert und somit nur sehr wenige Zellen durchflusszytometrisch untersucht werden (siehe die extrem flachen Kurven der Histogramme). Abbildung 4.21 (b) zeigt die Ergebnisse der Separation stimulierter peripherer mononukleärer Zellen. Unter der Verwendung des über SA-PE tetramersierten CD40L-DNS-Aptamers 5'B-C10-28 und

Anti-PE-MicroBeads konnten erfolgreich CD40L<sup>+</sup> Zellen mit einer Reinheit von 95 % angereichert werden. Die Depletion der ursprünglich 43 % CD40L<sup>+</sup> Zellen (Antikörper-Wert) auf lediglich 24 % war möglich, da das Aptamer augenscheinlich nicht das gleiche Bindungsverhalten wie der Antikörper hat. Schon in vorangegangenen durchflusszytometrischen Versuchen konnte diese Eigenschaft beobachtet werden (siehe 4.2.1.2. und 4.2.3.1). Die Kontrolle mit der unspezifischen Zufallssequenz 5'BC10-28scr zeigte bei den stimulierten PBMC eine schwache Abreicherung und erwartungsgemäß keine Anreicherung von CD40L<sup>+</sup> Zellen. Wie schon bei der unstimulierten Kontrolle konnten kaum Zellen aus der Säule eluiert werden (siehe extrem flache Kurve des Histogramms).

**Tabelle 4.4: Viabilität, Ausbeute und Reinheit der Zellen nach Aptamer-basierter Magnet-assoziiierter Zellseparation mithilfe des über SA-PE tetramerisierten CD40L-spezifischen Aptamers 5'B-C10-28 und Anti-PE-MicroBeads.**

	Aptamer-Tetramer, 5'Biotin (Spacer 36)	Viabilität (Zellen im R1- Fenster, %)			Gesamt CD40L <sup>+</sup> Zellen (bezogen auf AK-Daten, x 10 <sup>5</sup> )			Ausbeute CD40L <sup>+</sup> Zellen (%)	Reinheit der Zellen (%)	
		Vor Selektion	Nach Selektion		Vor Selektion	Nach Selektion			-	+
			-	+		-	+			
Unstim. PBMC (14 h)	C10-28scr	80	76	23	0,69	0,21	0,30	43,48	2	33
	C10-28	80	73	11	0,69	0,19	0,39	56,52	2	30
Stim. PBMC (PMA / Ionomyc. 14 h)	C10-28scr	46	79	21	21,08	2,15	0,14	0,66	26	35
	C10-28	46	74	60	21,08	0,43	1,52	7,21	24	95

In der Tabelle 4.4 sind Viabilität, Ausbeute und Reinheit der Zellen nach der Aptamer-basierten Magnet-assoziierten Zellseparation zusammengefasst. Vor allem die Ausbeute der positiven Selektion war mit 7,21 % trotz größerem Elutionsvolumen noch immer sehr gering. Es ist naheliegend, dass der Zellverlust, der vor allem bei stimulierten Zellen zu beobachten war, dadurch zustande kommt, dass die Zellen nach Stimulation mit PMA / Ionomycin sehr fragil waren und während der Separation zerstört wurden. Im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, das Verfahren der Aptamer-basierten Magnet-assoziierten Zellseparation weiter zu optimieren.

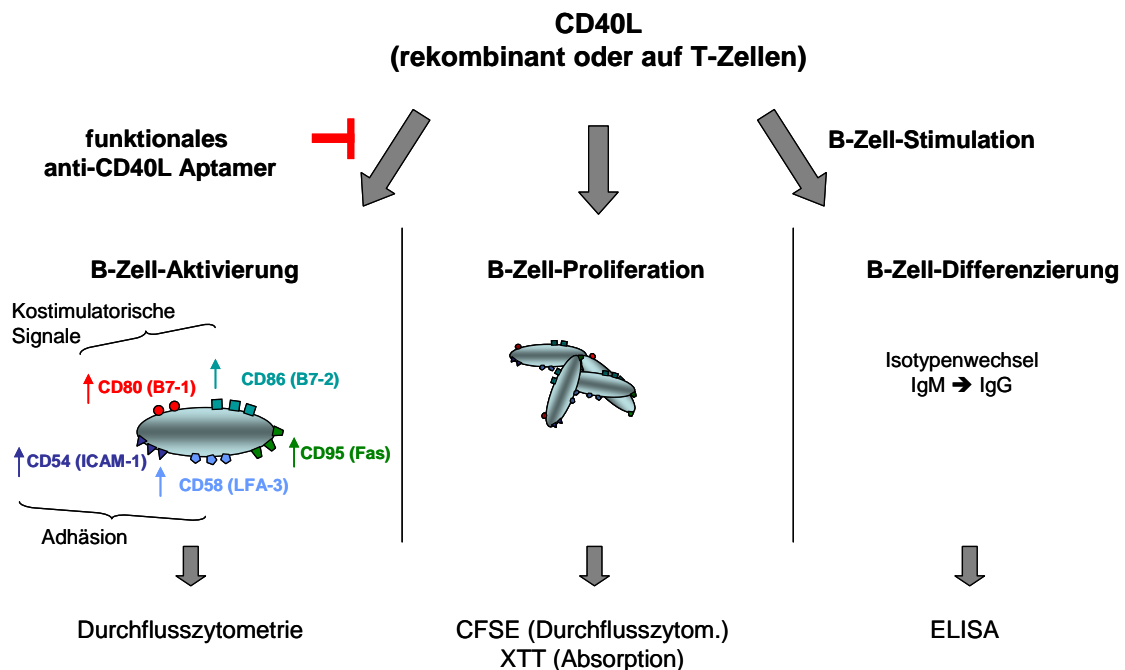
## **4.4 Funktionale Analyse des inhibitorischen Potentials der DNS-Aptamere**

Eine wichtige Fragestellung im Rahmen dieser Arbeit war die Funktionalität der DNS-Aptamere. Nachdem diese auf molekularer Ebene (siehe 4.1) und anhand einer Reihe durchflusszytometrischer Analysen (siehe 4.2) genauer charakterisiert wurden, sollte das inhibitorische Potential der DNS-Aptamere bestimmt werden. Dafür musste im ersten Schritt ein geeignetes zellbasiertes Untersuchungssystem entwickelt werden, mit dessen Anwendung die DNS-Aptamere und ihre Funktion anschließend analysiert wurden.

### **4.4.1 Etablierung des zellulären Untersuchungssystems**

Um das inhibitorische Potential der DNS-Aptamere ermitteln zu können, sind verschiedene zellbasierte Untersuchungssysteme möglich (siehe Abbildung 4. 22). Die Stimulation von B-Zellen über CD40L (rekombinant oder auf stimulierten T-Zellen) führt zur B-Zell-Aktivierung, -Proliferation sowie zur -Differenzierung. Die Aktivierung von B-Zellen lässt sich zeitnah (nach 6-24 h) über die Aufregulation von kostimulatorischen Molekülen (z. B. CD80, CD86) oder Adhäsionsmolekülen (z. B. CD54, CD58) durchflusszytometrisch bestimmen, während B-Zell-Proliferation und -Differenzierung erst nach mehreren Tagen zu beobachten sind. Die Anwesenheit eines funktionalen CD40L-spezifischen Aptamers sollte die B-Zell-Stimulation und somit auch die B-Zell-Aktivierung, -Proliferation und -Differenzierung wiederum inhibieren. Im Hinblick auf die Stabilität der DNS-Aptamere, die in vorhergehenden Versuchen (Filterbindungsanalyse siehe 4.1.2; Durchflusszytometrie siehe 4.2.2) in Medium mit Humanserum für 18 bis 24 h bestätigt werden konnte, wurden in dieser Arbeit die zügigen Effekte der B-Zell-Aktivierung untersucht. Dafür wurden zunächst eine Reihe zellbasierter Untersuchungen entwickelt und miteinander verglichen. Dabei war es von besonderer Bedeutung, einen passenden Aktivierungsmarker auf B-Zellen sowie die jeweils geeigneten Konzentrationsbereiche für die verschiedenen CD40L-basierenden Stimulationsarten zu bestimmen, die zu einer deutlichen Aufregulation des Aktivierungsmarkers in einem relativ kurzen Zeitfenster (18 bis 24 h) führen. Um zu untersuchen, ob eine Inhibition der aktivierungsinduzierten Expression eines kostimulatorischen Moleküls oder Adhäsionsmoleküls überhaupt möglich ist, wurde ein funktionaler, inhibierender anti-CD40L-Antikörper (Klon 2B7 von E. Kremmer)

verwendet, dessen optimaler Konzentrationsbereich zunächst ebenfalls bestimmt werden musste.



**Abb. 4.22: Mögliche Ansätze zur Ermittlung des inhibitorischen Potentials von CD40L-spezifischen DNS-Aptameren.** Die B-Zell-Stimulation über CD40L (rekombinant oder auf stimulierten T-Zellen) führt zur B-Zell-Aktivierung, -Proliferation sowie zur -Differenzierung. Die B-Zell-Aktivierung lässt sich durchflusszytometrisch über die Aufregulation von kostimulatorischen Molekülen (z. B. CD80, CD86) oder Adhäsionsmolekülen (z. B. CD54, CD58) untersuchen. Die B-Zell-Proliferation kann mithilfe von Proliferationsanalysen (z. B. CFSE oder XTT) beobachtet werden. Die B-Zell-Differenzierung lässt sich anhand des Isotypenwechsels (IgM → IgG) über ELISA analysieren (Tangye et al., 2002). Die Zugabe eines funktionalen CD40L-Aptamers sollte die B-Zell-Stimulation und somit auch die B-Zell-Aktivierung, -Proliferation und -Differenzierung inhibieren.

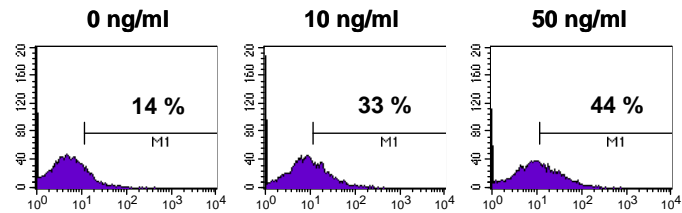
Es gibt verschiedene Möglichkeiten B-Zellen *in vitro* mithilfe von rekombinantem CD40L zu stimulieren (Übersicht über verschiedene CD40L-Produkte in Tabelle 4.1). ENZO Life Sciences bietet zwei kommerziell erhältliche Varianten. *MegaCD40L*<sup>TM</sup> ist ein hoch aktives Konstrukt aus zwei CD40L-Trimeren, die artifiziell über die Kollagen-Domäne des *ACRP30headless* Fusionsproteins verknüpft sind (siehe 3.2.6.1). Außerdem wird ein Set angeboten, das sich zusammensetzt aus der extrazellulären Domäne des humanen CD40-Ligand (rekombinant und löslich), die am N-Terminus an ein Verbindungspeptid (6 aa) und einen Flag<sup>®</sup>-Tag fusioniert ist, sowie einem Verstärkermolekül (engl.: „Enhancer“) für Liganden, das die biologische Aktivität des rekombinanten CD40L laut Herstellerangaben mindestens um das 1000-fache erhöht (siehe 3.2.6.2). Da lösliches CD40L-Monomer allein zur *in vitro* Stimulation von B-

Zellen nicht ausreicht, wurden Dynabeads® M450-Epoxy (Invitrogen™) mit löslichem rekombinantem CD40L (PeproTech) gekoppelt (siehe 3.1.10) und zur Stimulation verwendet (siehe 3.2.6.4). Außerdem besteht die Möglichkeit, B-Zellen über CD40L auf der Oberfläche von T-Zellen zu stimulieren (siehe 3.2.6.3). Dafür wurden einerseits isolierte T-Zellen, die über 18 h mit PMA / Ionomycin stimuliert wurden, zu isolierten B-Zellen im autologen System gegeben. Andererseits wurden T-Zellen innerhalb von Gesamt-PBMC mit Dynabeads® CD3/CD28 (Invitrogen™) stimuliert, damit es zur CD40L-Expression auf der T-Zell-Oberfläche kam und somit die enthaltenen B-Zellen über die CD40-CD40L-Interaktion stimuliert wurden. Nach einer Stimulation der B-Zellen von 18 h in 96-Loch-Rundboden-Testplatten mit einem Gesamt-Volumen von 200 µl und 1,5 bis  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung (RPMI-Medium für frisch isolierte Zellen: RPMI-1640, 1 % HS, 1 % L-Glutamin, 1 % Pen/Strep, siehe 2.8) wurde jeweils die Aufregulation von CD86 (B7-2) und CD95 (Fas) auf der Oberfläche von B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) durchflusszytometrisch bestimmt. Um die Grenze zwischen positivem und negativem Signal zu setzen, wurde eine Messung mit einer PE-konjugierten Isotypkontrolle durchgeführt (siehe 3.3.2).

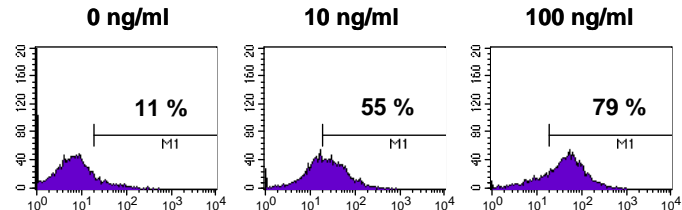
In Abbildung 4.23 sind die Ergebnisse der CD86-Expression auf B-Zellen zusammenfassend dargestellt. Dafür wurden nur CD19<sup>+</sup> Zellen (= B-Lymphozyten) in die Auswertung miteinbezogen. Für die Stimulation von B-Zellen mit *MegaCD40L*™ reichte eine Konzentration von 10 ng/ml für eine deutliche Aufregulation von CD86 aus (unstimuliert 14 %; 10 ng/ml 33 % und 50 ng/ml 44 %, Abbildung 4.23 (a)). Durch höhere Konzentrationen konnte die Expression noch gesteigert werden. Bei der Stimulation mit steigenden Konzentrationen an sCD40L in Kombination mit konstant 1 µg/ml Verstärkermolekül (Enhancer) wurde eine starke konzentrationsabhängige Aufregulation von CD86 beobachtet (unstimuliert: 11 %; 10 ng/ml 55 %, 100 ng/ml 79 %; Abbildung 4.23 (b)). Weniger deutlich war die Expression von CD86 nach Stimulation mithilfe von  $1 \times 10^6$ /ml oder  $5 \times 10^6$ /ml CD40L-gekoppelten Dynabeads® M450-Epoxy ( $0,75 \times 10^6$  Zellen / ml) (unstimuliert: 28 %, CD40L-Kügelchen 38-39 %, Abbildung 4.23 (c)). Die Expression von CD86 auf B-Lymphozyten ließ sich auch durch die Kultur mit autologen, stark CD40L<sup>+</sup> T-Zellen (PMA / Ionomycin für 18 h, 70 - 80 % CD40L<sup>+</sup>) hochregulieren (36 %), während die Kultur mit unstimulierten, CD40L<sup>-</sup> T-Zellen keine verstärkte CD86-Expression mit sich brachte (13 %) (Abbildung 4.23 (d)). Auch die Aktivierung von B-Lymphozyten innerhalb von PBMC über die Stimulation der enthaltenen T-Zellen durch Zugabe von Dynabeads® CD3/CD28 ergab eine deutliche Aufregulation der CD86-Expression auf der Oberfläche von B-Zellen (unstimuliert: 28 %;  $2 \times 10^5$  Beads / ml: 66 %; Abbildung 4.23 (e)).



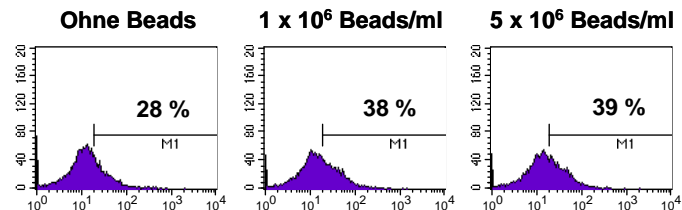
(a) B-Zellen stimuliert  
mit *MegaCD40L*<sup>TM</sup>  
(Hexamer, ENZO)



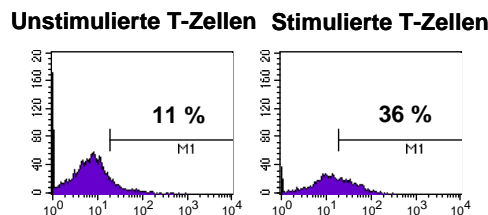
(b) B-Zellen stimuliert  
mit sCD40L + Enhancer  
(1 µg/ml) (ENZO)



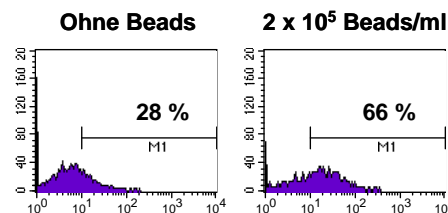
(c) B-Zellen stimuliert  
mit CD40L (PeproTech)  
gekoppelten  
Dynabeads® M450-  
Epoxy (Invitrogen<sup>TM</sup>)



(d) B-Zellen und  
stimulierte CD40L<sup>+</sup>  
T-Zellen (1 + 1)  
(PMA / Ionomycin,  
Sigma)



(e) B-Zellen und  
stimulierte T-Zellen  
innerhalb von PBMC  
(Dynabeads® CD3/CD28,  
Invitrogen<sup>TM</sup>)



anti-CD86-FITC

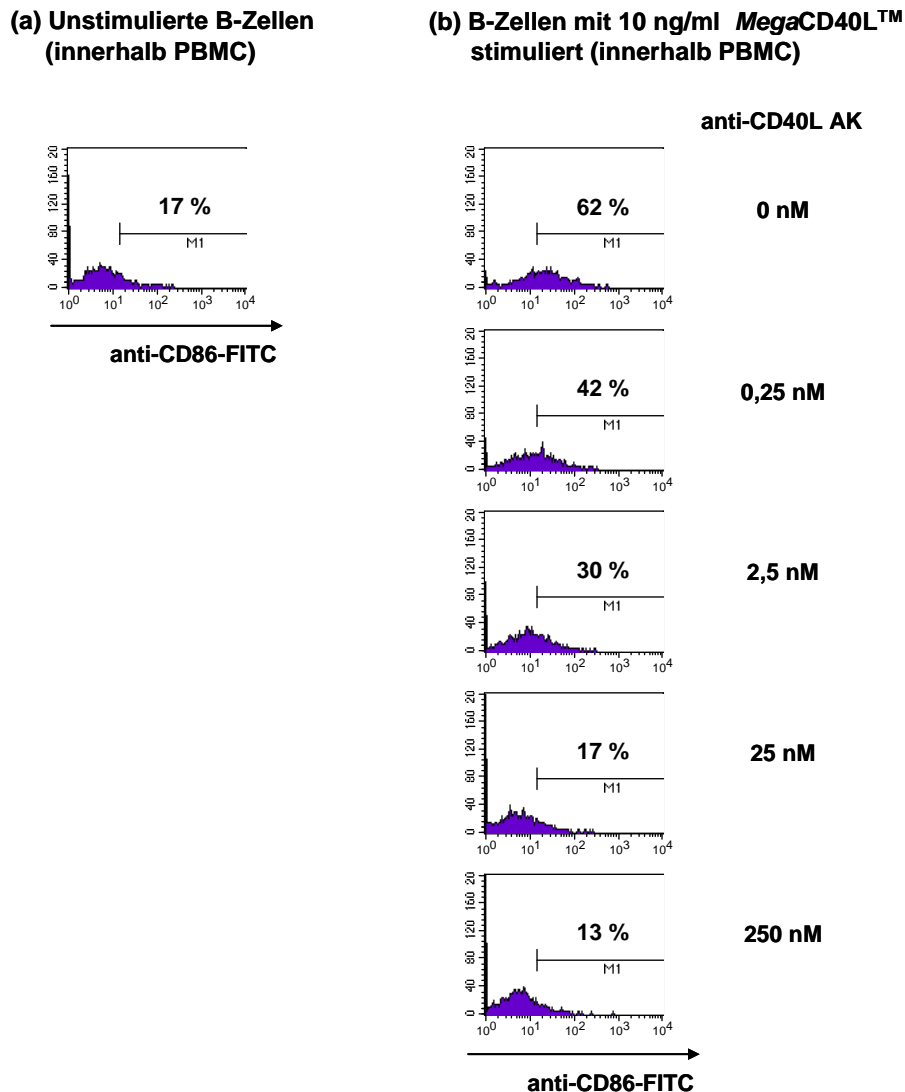
**Abb. 4.23: Durchflusszytometrische Analyse der CD86-Expression humaner B-Zellen, die mithilfe unterschiedlicher Ansätze über die CD40-CD40L-Interaktion für 18 h stimuliert wurden.** B-Zellen eines freiwilligen gesunden Spenders wurden isoliert und über 18 h stimuliert: (a) mit steigenden Konzentrationen an *MegaCD40L*<sup>TM</sup> (0, 50 und 100 ng/ml; ENZO Life Sciences); (b) mit steigenden Konzentrationen an rekombinantem löslichen CD40L Protein (0, 10 und 100 ng/ml) in Gegenwart eines Verstärkermoleküls (Enhancer, 1 ng/µl); (c) mit CD40L (PeproTech) gekoppelten Dynabeads® M450-Epoxy (Invitrogen<sup>TM</sup>) (1 x 10<sup>6</sup> und 5 x 10<sup>6</sup> Beads pro 1 x 10<sup>6</sup> B-Zellen); (d) 1 + 1 mit CD40L<sup>+</sup> T-Zellen (vorangegangene Isolation und Stimulation der autologen T-Zellen mit PMA / Ionomycin für 18 h). Außerdem wurden T-Zellen innerhalb von PBMC mit anti-CD3/CD28 Dynabeads® (Invitrogen<sup>TM</sup>) zur Aufregulation von CD40L für 18 h stimuliert und so die enthaltenen B-Zellen aktiviert (e). Nach 18 h erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Zellen. Die Ergebnisse zeigen die CD86-Expression auf B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) in Form von Histogrammen. Die Grenze zwischen positivem und negativem Signal wurde mithilfe einer Messung mit einer PE-konjugierten Isotypkontrolle gesetzt.

Die Ergebnisse der CD95-Expression ergaben ein ähnliches Muster (Daten hier nicht gezeigt), allerdings waren die Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten B-Zellen weniger deutlich. In weiteren Untersuchungen wurde deshalb nur noch die CD86-Expression bestimmt. Die Unterschiede der CD86-Expression unstimulierter B-Zellen kommen durch verschiedene Spender zustande.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob eine Inhibition der aktivierungs-induzierten Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 (B7-2) überhaupt möglich ist. Dafür wurde ein inhibierender anti-CD40L-Antikörper (Klon 2B7 von E. Kremmer) verwendet, dessen optimaler Konzentrationsbereich zunächst bestimmt werden sollte. Humane B-Zellen wurden innerhalb von Gesamt-PBMC über 18 h mit 10 ng/ml *MegaCD40L*<sup>TM</sup> (ENZO Life Sciences) stimuliert (siehe 3.2.6.1). Durch die Zugabe steigender Konzentrationen des anti-CD40L-Antikörpers (Klon 2B7, 0, 0,25, 2,5, 25 und 250 nM) sollte dessen optimaler Konzentrationsbereich für eine erfolgreiche Inhibition der Stimulation untersucht werden. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Abbildung 4.24 dargestellt. Abgebildet ist die CD86-Expression auf B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) in Form von Histogrammen. Um die Grenze zwischen positivem und negativem Signal zu setzen, wurde eine Messung mit einer PE-konjugierten Isotypkontrolle durchgeführt (siehe 3.3.2). Als Kontrolle kamen unstimulierte B-Zellen innerhalb von Gesamt-PBMC zum Einsatz (Abbildung 4.24 (a)). Der optimale Konzentrationsbereich, in dem der anti-CD40L-Antikörper die aktivierungsinduzierte CD86-Expression auf das Niveau unstimulierter B-Zellen inhibiert, liegt zwischen 25 und 250 nM (Abbildung 4.24 (b)).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Methoden auf Basis der CD40-CD40L-Interaktion zur Stimulation von B-Zellen die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 innerhalb von 18 h deutlich erhöhen, was sich durch die Zugabe von 25 bis 250 nM des funktionalen anti-CD40L-Antikörpers (Klon 2B7) inhibieren lässt. Im Hinblick auf die Ergebnisse der Untersuchungen zur molekularen Charakterisierung der CD40L-spezifischen DNS-Aptamere scheint vor allem die Verwendung des „CD40L, Soluble (human) (recombinant) Set“ (ENZO Life Sciences) zur Analyse des inhibitorischen Potentials vielversprechend. In Filterbindungsanalysen konnte eine deutliche Bindung an das rekombinante lösliche CD40L dieses Sets gezeigt werden (siehe 4.1.1, Abbildungen 4.2 und 4.3), jedoch keine Bindung an *MegaCD40L*<sup>TM</sup> (ENZO Life Sciences). In den B-Zell-stimulationsversuchen zeigte sCD40L in Kombination mit dem Verstärkermolekül („Enhancer“) die deutlichsten Effekte (Abbildung 4.22 (b)). Dagegen bewirkten

Dynabeads® M450-Epoxy (Invitrogen™) gekoppelt mit sCD40L (PeproTech), die in durchflusszytometrischen Untersuchungen eine klare Bindung der verschiedenen Variationen des DNS-Aptamers S51A-C10 ergaben (siehe 4.2), nur eine schwache Aufregulation von CD86 (Abbildung 4.22 (c)). Vergleichbare Untersuchungen wurden ebenfalls mit weiteren CD40L-basierten Stimulationsansätzen mit vergleichbarem Ergebnis durchgeführt (Daten hier nicht gezeigt).



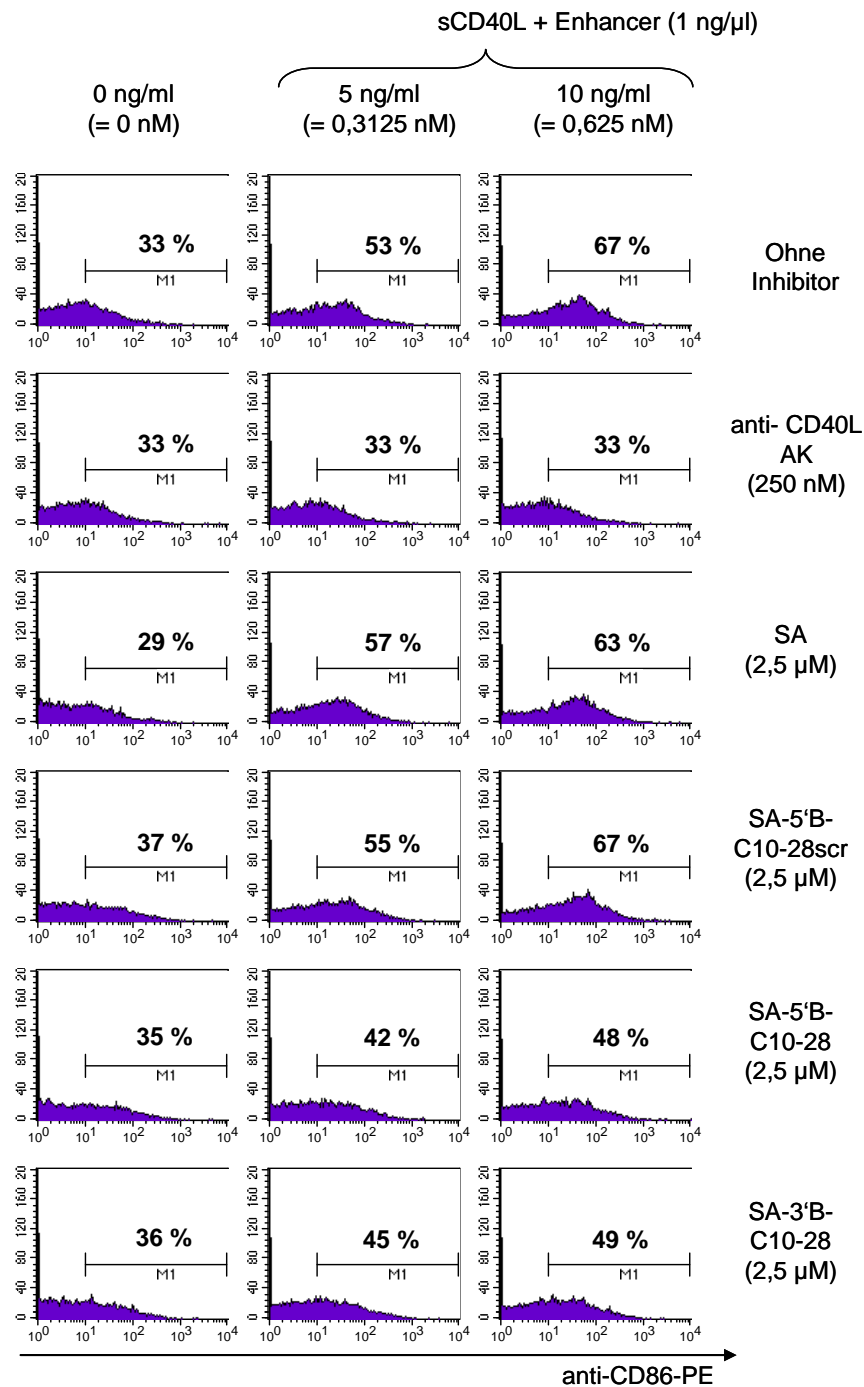
**Abb. 4.24: Durchflusszytometrische Analyse der B-Zell-Stimulation innerhalb PBMC mittels MegaCD40L™ sowie deren Inhibition mit steigenden Konzentrationen des anti-CD40L-Antikörpers (Klon 2B7).** Humane B-Zellen wurden über 18 h innerhalb von Gesamt-PBMC mit 10 ng/ml MegaCD40L™ (ENZO Life Sciences) stimuliert (b). Als Kontrolle kamen unstimulierte B-Zellen innerhalb PBMC zum Einsatz (a). Durch die Zugabe steigender Konzentrationen des anti-CD40L-Antikörpers (Klon 2B7, 0, 0,25, 2,5, 25 und 250 nM) sollte dessen optimaler Konzentrationsbereich für eine erfolgreiche Inhibition der Stimulation untersucht werden (b). Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse zeigen die CD86-Expression auf B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) in Form von Histogrammen. Der optimale Konzentrationsbereich des anti-CD40L-Antikörpers für eine erfolgreiche Inhibition der aktivierungsinduzierten Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 (B7-2) liegt zwischen 25 und 250 nM. In diesem Bereich sind die Werte CD86-Expression mit dem Wert der unstimulierten Kontrolle vergleichbar.

#### 4.4.2 Inhibition der B-Zell-Aktivierung durch CD40L-DNS-Aptamere

Nachdem die Bedingungen eines zellulären Systems zur Untersuchung des inhibitorischen Potentials bestimmt wurden (siehe 4.4.1), sollten die bereits molekular und durchflusszytometrisch charakterisierten und vielversprechenden Variationen des DNS-Aptamers S51A-C10 in dieses System eingesetzt und untersucht werden.

Für die funktionalen Analysen der DNS-Aptamere (siehe 3.2.7) wurden B-Zellen eines gesunden Spenders über Dichtegradienten-Zentrifugation (siehe 3.2.1) und Magnet-assoziierte Zellseparation (siehe 3.2.2.1) isoliert (Reinheit > 95 %) und mit steigenden Konzentrationen an rekombinantem löslichen CD40L Protein (5 und 10 ng/ml) in Gegenwart eines Verstärkermoleküls (Enhancer, 1 ng/μl) für 18 Stunden stimuliert (siehe 3.2.6.2). Unstimulierte B-Zellen dienten als Kontrolle. Der stark inhibierende anti-CD40L-Antikörper (Klon 2B7 von E. Kremmer) wurde in einer Konzentration von 250 nM als Inhibitionskontrolle eingesetzt. Der Einsatz von monomeren DNS-Aptameren (125, 250 und 500 nM) in den Versuchsansatz zeigte keinen Einfluss auf die CD86-Expression (Daten hier nicht gezeigt). Deshalb sollte durch Tetramerisierung der monovalenten Aptamere die Bindungsstärke des daraus resultierenden Gesamtmoleküls verbessert werden (Aviditätseffekt) (siehe 4.2.1). Die verkürzten CD40L-spezifischen DNS-Aptamerklone C10-28 mit Biotinylierung am 5'- oder 3'-Ende sowie das unspezifische Kontrollaptamer 5'B-C10-28scr wurden über Streptavidin (SA, Roche Applied Science) tetramerisiert (siehe 3.1.11.1) und in den Konzentrationen 25, 250, 500, 1250, 2500 nM (bezogen auf Streptavidin) eingesetzt. Als Kontrolle wurde zusätzlich auch die entsprechende Konzentration an Streptavidin eingesetzt, um Effekte durch Streptavidin selbst ausschließen zu können.

In Abbildung 4.25 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der CD86-Expression in Form von Histogrammen dargestellt. Zur Unterscheidung von positivem und negativem Signal wurde eine Messung mit einer PE-konjugierten Isotypkontrolle durchgeführt (siehe 3.3.2). Durch die Zugabe der über Streptavidin (SA) tetramerisierten CD40L-spezifischen DNS-Aptamerklone (SA-5'B-C10-28; SA-3'B-C10-28, Ergebnisse gezeigt für 2,5 μM) gelang die partielle Inhibition der aktivierungs-induzierten Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 (B7-2). Der stark inhibierende anti-CD40L-Antikörper (Klon 2B7, 250 nM) bewirkte, wie erwartet, die komplette Inhibition der CD86-Expression auf das Niveau unstimulierter B-Zellen. Streptavidin allein (SA, hier 2,5 μM) sowie das tetramerisierte unspezifische Kontrollaptamer SA-5'B-C10-28scr (hier 2,5 μM) zeigten keinen Effekt.



**Abb. 4.25: Durchflusszytometrische Analyse der B-Zell Stimulation mittels sCD40L und Verstärkermolekül (Enhancer) sowie deren partielle Inhibition mithilfe von tetramerisierten DNS-Aptameren.** Aufgereinigte B-Zellen eines gesunden Spenders (Reinheit > 95%) wurden mit steigenden Konzentrationen an rekombinantem löslichen CD40L Protein (5 und 10 ng/ml) in Gegenwart eines Verstärkermoleküls (Enhancer, 1 ng/μl) für 18 Stunden stimuliert. Durch Zugabe der über Streptavidin (SA) tetramerisierten CD40L-DNS-Aptamerklone (SA-5'B-C10-28; SA-3'B-C10-28, 2,5 μM) gelang die partielle Inhibition der aktivierungs-induzierten Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 (B7-2). Ein stark inhibierender anti-CD40L-Antikörper (Klon 2B7) wurde als Inhibitionskontrolle eingesetzt (250 nM). Streptavidin allein (SA, 2,5 μM) sowie das tetramerisierte unspezifische Kontrollaptamer SA-5'B-C10-28scr (2,5 μM) zeigten keinen Effekt. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der CD86-Expression sind in Form von Histogrammen dargestellt.

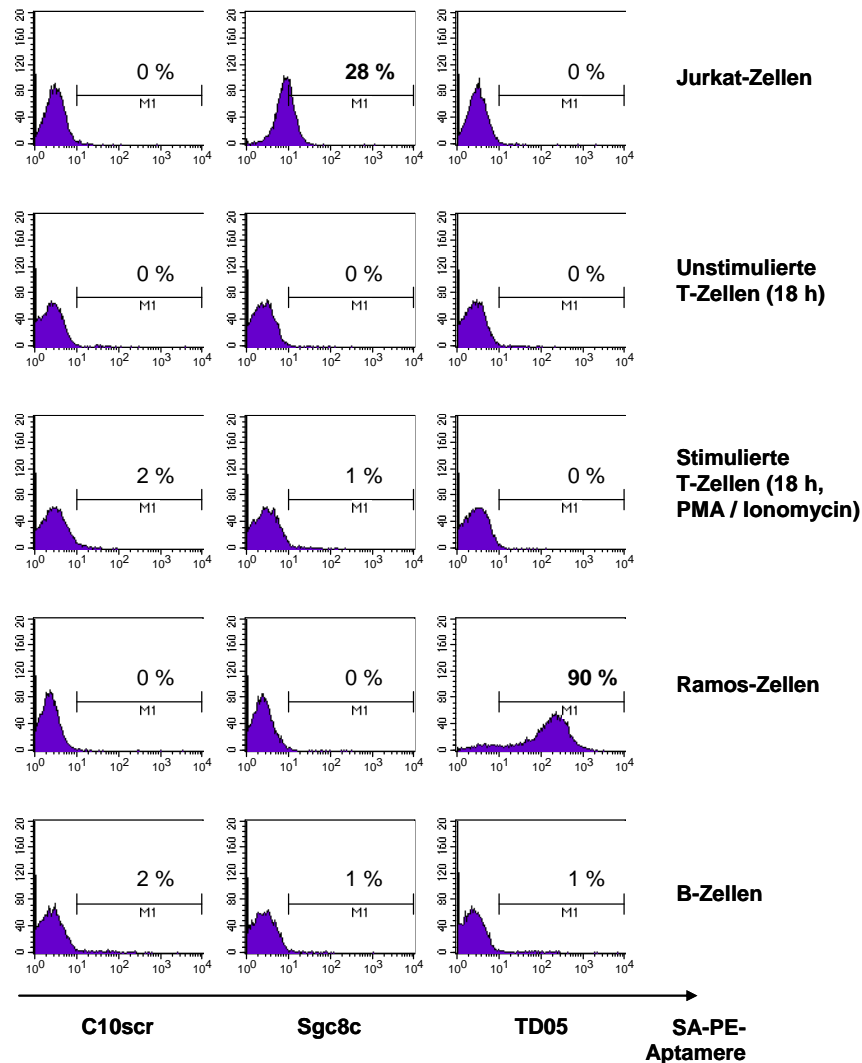
## 4.5 Verbrückung von T- und B-Zellen über multimerisierte DNS-Aptamere

Im Rahmen von Vorexperimenten, um das Prinzip an sich zu beweisen („proof of principle“), wurde das klinisch aussichtsreiche Konzept der „Redirektion von Immuneffektorzellen“ durch Verbrückung von Tumor und Immuneffektorzellen aufgegriffen. Dafür wurden aus der Literatur bekannte DNS-Modellaptamere TD05 sowie Sgc8c verwendet, um konzeptionell die Entwicklung von bispezifischen, multivalenten Aptameren anzulegen. TD05 erkennt die schwere Kette  $\mu$  von Membran-gebundenem IgM auf Burkitt-Lymphomzellen (z. B. Ramos) und ist 88 Nukleotide lang (Mallikaratchy et al., 2007). Sgc8c erkennt die Protein-Tyrosin-Kinase 7 (PTK 7) auf T-Zell-Lymphom-Zellen (z.B. Jurkat) und ist 41 Nukleotide lang (Shangguan et al., 2008).

### 4.5.1 Durchflusszytometrische Bindungsanalysen der DNS-Modellaptamere TD05 und Sgc8c

Bevor mit den beiden Modellaptameren unterschiedliche Zelltypen miteinander verbrückt wurden, sollten die Aptamere in durchflusszytometrischen Untersuchungen hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften sowie ihrer Spezifität analysiert werden.

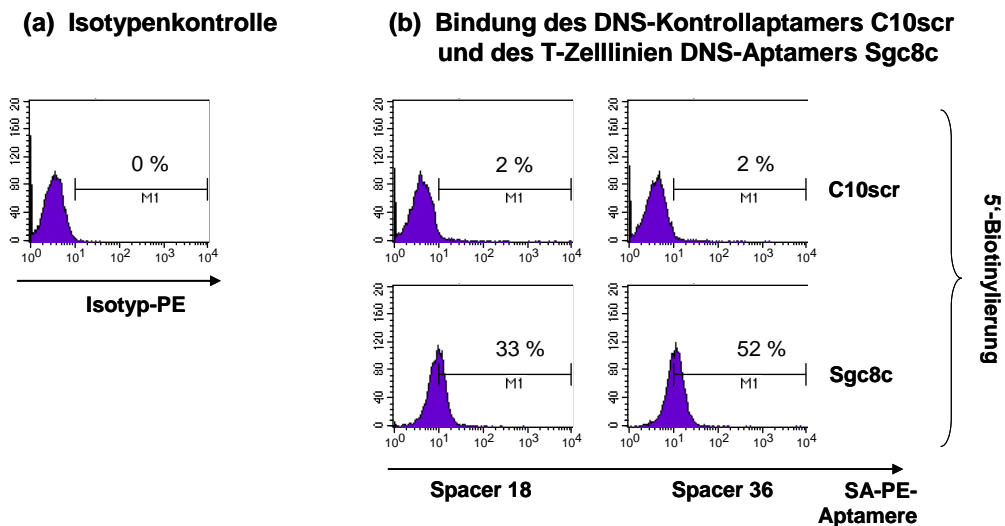
Dafür wurden im ersten Schritt die Aptamere Sgc8c und TD05 mit Biotinylierung am 5'-Ende und einem HEG-Baustein als Abstandhalter (= Spacer 18) (synthetisiert von Metabion) über PE-konjugiertes Streptavidin (SA-PE, Invitrogen™) tetramerisiert (siehe 3.1.11.1). Als Negativkontrolle kam das unspezifische Aptamer C10scr zum Einsatz. Die tetramerisierten Aptamere wurden auf ihre Bindung an die ALL T-Zelllinie Jurkat, an frisch isolierte unstimulierte und stimulierte T-Zellen, an die B-Zell-Lymphom-Zelllinie (Burkitt) Ramos und an frisch isolierte B-Zellen untersucht. T- und B-Zellen wurden dafür mittels Dichtegradienten-Zentrifugation (siehe 3.2.1) und Magnet-assoziiierter Zellseparation (siehe 3.2.2.1) isoliert. Es wurden sowohl unstimulierte, als auch über 18 h mit PMA / Ionomycin stimulierte (siehe 3.2.5.1) T-Zellen analysiert. Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurden die verschiedenen Zellen, wie unter 3.3.3.2 beschrieben, mit Aptameren markiert. Der Bindungsansatz erfolgte mit einem Gesamt-Volumen von 100  $\mu$ l (hier Inkubationspuffer, siehe 2.8).



**Abb. 4.26: Durchflusszytometrische Bindungsanalyse der DNS-Modellaptamere Sgc8c (ALL T-Zelllinien-Binder) und TD05 (Ramos-Binder) auf verschiedenen Zelltypen.** Das unspezifische Kontrollaptamer C10scr, das ALL-T-Zelllinien Aptamer Sgc8c sowie das Ramos-Aptamer TD05 (beide aus der Literatur bekannt) wurden auf ihre Bindung an Jurkat-Zellen, frisch isolierte unstimulierte und stimulierte (18 h PMA / Ionomycin) T-Zellen, Ramos-Zellen und frisch isolierte B-Zellen getestet. Alle drei Aptamere hatten eine Biotinylierung am 5'-Ende mit einem HEG-Baustein als Abstandhalter (Spacer 18) und wurden über PE-konjugiertes Streptavidin tetramerisiert. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Form von Histogrammen dargestellt.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Abbildung 4.26 in Form von Histogrammen zusammengefasst. Erwartungsgemäß zeigte das tetramerisierte Kontrollaptamer C10scr an keine der untersuchten Zelltypen eine Bindung (0 bis 2 %). Für das aus der Literatur bekannte ALL T-Zelllinien Aptamer Sgc8c ergab sich ausschließlich auf Jurkat-Zellen ein positives Signal, das allerdings mit nur 28 % vergleichsweise schwach war. Das Bindungssignal des TD05-Aptamers (ebenfalls aus der Literatur bekannt) war nur auf Ramos-Zellen mit 90 % stark positiv, auf allen anderen Zelltypen negativ (0 bis 1 %).

Da das über Streptavidin tetramerisierte Modellaptamer Sgc8c (mit 5'-Biotinylierung und einem HEG-Baustein als Abstandhalter) auf Jurkat-Zellen nur ein Signal von knapp 30 % erzielte, wurde in Analogie zum CD40L-spezifischen DNS-Aptamer C10 (siehe 4.2.1.2) untersucht, ob die Verdopplung des Abstands zwischen Biotin und Aptamersequenz ebenfalls einen positiven Einfluss auf das Bindungsverhalten von Sgc8c hat. Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurden das unspezifische Kontrollaptamer C10scr als Negativkontrolle sowie das Modellaptamer Sgc8c jeweils 5'-biotinyliert mit einem oder zwei HEG-Bausteinen als Abstandhalter über PE-konjugiertes Streptavidin (SA-PE, Invitrogen™) tetramerisiert (siehe 3.1.11.1). Die Markierung der Jurkat-Zellen mit den tetramerisierten Aptameren erfolgte in einem Bindungsansatz von 100 µl Gesamt-Volumen (hier Inkubationspuffer, siehe 2.8). Um die Grenze zwischen positivem und negativem Signal setzen zu können wurde auch ein Ansatz mit einer PE-konjugierten Isotypenkontrolle (siehe 3.3.2) durchgeführt. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Abbildung 4.27 in Form von Histogrammen zusammengefasst. Während die Verlängerung des Abstandhalters keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten des Kontrollaptamers C10scr zeigt (2 % bei Spacer 18 und Spacer 36), konnte das Bindungssignal des Modellaptamers Sgc8c auf Jurkat-Zellen von 33 % (Spacer 18) auf 52 % (Spacer 36) verbessert werden.

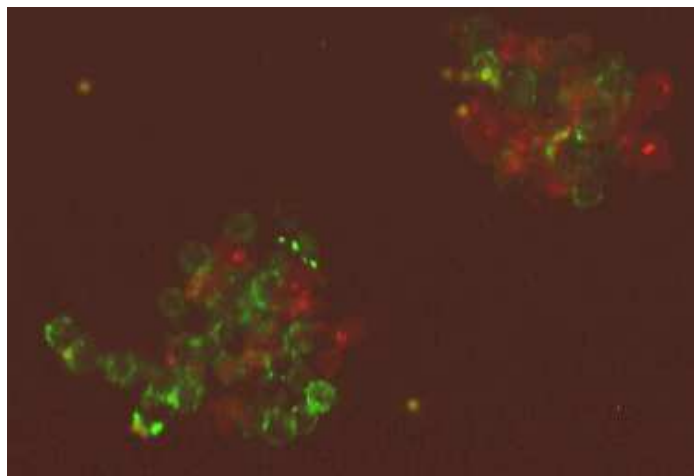


**Abb. 4.27: Durchflusszytometrische Bindungsanalyse des DNS-Modellaptamers Sgc8c (ALL T-Zelllinien-Binder) mit einem oder zwei HEG-Bausteinen als Abstandhalter auf Jurkat-Zellen.** Jurkat-Zellen wurden mit einer PE-konjugierten Isotypenkontrolle (a) sowie mit biotinylierten Sgc8c Aptameren markiert (b), die über PE-fluoreszenzmarkiertes Streptavidin tetramerisiert worden waren. Die Biotinylierung war am 5'-Ende des Aptamers mit einem (Spacer 18) oder zwei HEG-Bausteinen (Spacer 36) als Abstandhalter angebracht. Das DNS-Modellaptamer Sgc8c ist ein aus der Literatur bekanntes Aptamer, das ALL T-Zelllinien bindet. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Form von Histogrammen dargestellt.



#### 4.5.2 Fluoreszenzmikroskopie verbrückter Zellen

Die Verbrückung von Ramos- und Jurkat-Zellen über multimerisierte bispezifische Aptamere (Multimerisierung der 5'-biotinylierten Aptamere über Dynabeads® Streptavidin, siehe 3.1.11.2) sollte fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Dafür wurden Ramos-Zellen mit einem FITC-konjugiertem anti-CD20-Antikörper und Jurkat-Zellen mit einem PE-konjugiertem anti-CD3-Antikörper markiert (siehe 3.3.2) und durch multimerisierte bispezifische Aptamere miteinander verbrückt (siehe 3.2.8). Als Kontrollen wurden unspezifische Aptamer-Multimere (5'B-C10scr) sowie multimerisierte monospezifische Aptamere (nur 5'B-TD05 bzw. nur 5'B-Sgc8c) eingesetzt. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden in der Firma TRION Research GmbH an einem BX51 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg/D) durchgeführt und mithilfe des Programms MDS (Micrometastasis Detection System, Applied Imaging Corp.) aufgenommen und ausgewertet.



**Abb. 4.28: Fluoreszenzmikroskopische Visualisierung von verbrückten B-Zellen (Ramos; CD20-FITC) und T-Zellen (Jurkat; CD3-PE) durch multimerisierte bispezifische Aptamere (TD05 / Sgc8c).** Ramos-Zellen wurden mit einem FITC-konjugiertem anti-CD20-Antikörper, Jurkat-Zellen mit einem PE-konjugiertem anti-CD3-Antikörper markiert und über multimerisierte bispezifische Aptamere miteinander verbrückt. Die Multimerisierung der 5'-biotinylierten DNS-Modellaptamere TD05 (Ramos) und Sgc8c (Jurkat) erfolgte mithilfe von Dynabeads® Streptavidin.

Die Verbrückung der Ramos- (anti-CD20 FITC) und Jurkat-Zellen (anti-CD3 PE) durch multimerisierte bispezifische Aptamere konnte fluoreszenzmikroskopisch sehr deutlich gezeigt werden (siehe Abbildung 4.28). Im Kontrollansatz mit dem unspezifischen multimerisierten Aptamer C10scr wurde dagegen keine Aneinanderlagerung von Ramos- und Jurkat-Zellen beobachtet. Und auch die Kontrollansätze mit den

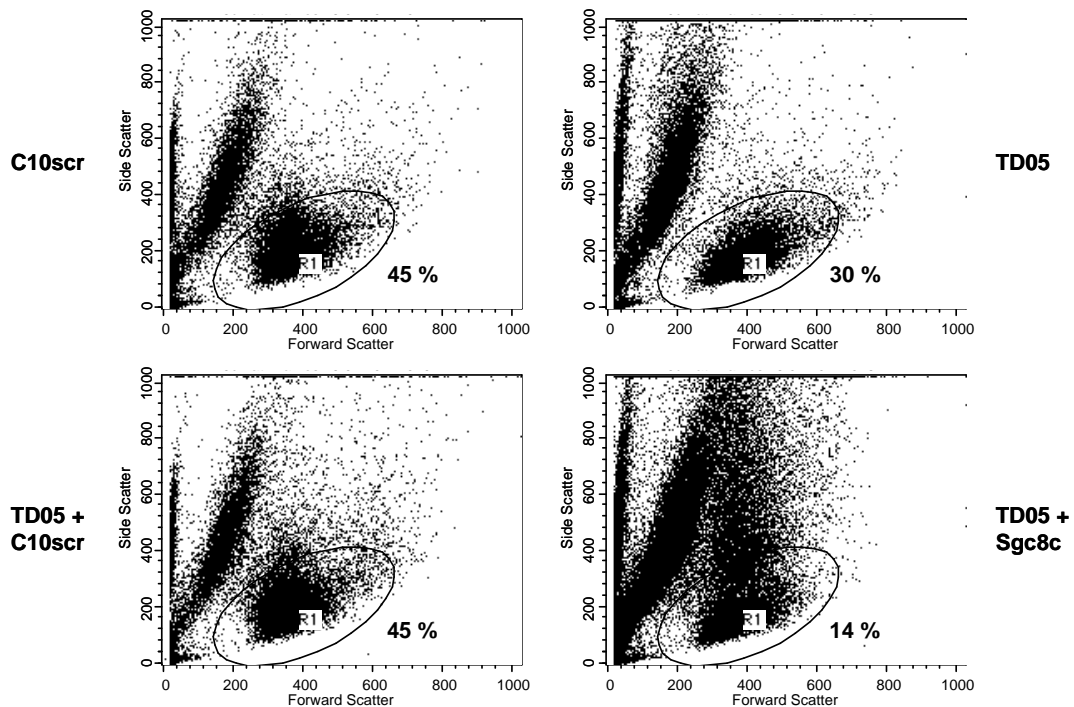
monospezifischen multimerisierten Aptameren (nur TD05 bzw. nur Sgc8c) ergaben erwartungsgemäß keine heterogenen Zellansammlungen von Ramos- und Jurkat-Zellen (Daten hier nicht gezeigt).

#### **4.5.3 Durchflusszytometrische Analyse verbrückter Zellen**

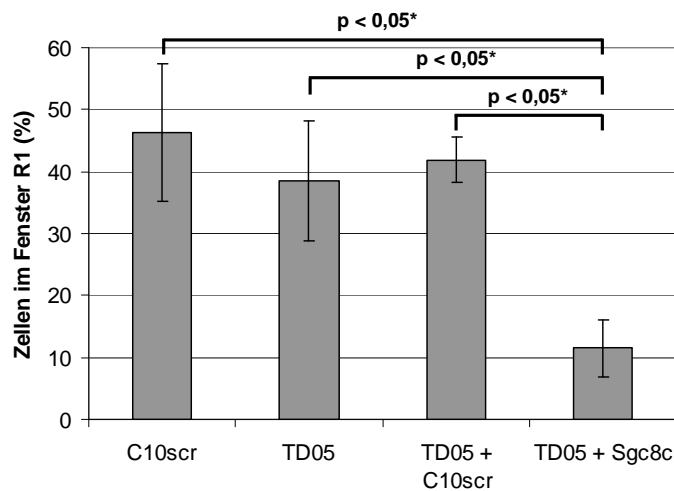
Im Rahmen der Vorexperimente mit den Modellaptameren TD05 (Ramos) sowie Sgc8c (Jurkat) sollte die Verbrückung von Tumor- und Effektorzelllinien sowie die dadurch vermittelte Zelllyse durchflusszytometrisch untersucht werden.

Die Verbrückung von Ramos- und Jurkat-Zellen wurde über multimerisierte bispezifische Aptamere (Multimerisierung über Dynabeads® Streptavidin, siehe 3.1.11.2) angesetzt. Dafür wurden Ramos-Zellen mit einem FITC-konjugiertem anti-CD20-Antikörper und Jurkat-Zellen mit einem PE-konjugiertem anti-CD3-Antikörper markiert (siehe 3.3.2) und durch multimerisierte bispezifische Aptamere miteinander verbrückt (siehe 3.2.8). Als Kontrollen wurden das unspezifische 5'B-C10scr, das Ramos-Aptamer 5'B-TD05 sowie eine Kombination aus TD05 und C10scr multimerisiert. Der Verbrückungsansatz wurde nach dem üblichen Vorgehen durchflusszytometrisch untersucht. Nach 10.000 Ereignissen im Fenster R1 wurde die Messung abgestoppt. Das Fenster R1 entsprach näherungsweise den lebenden Zellen (die Zellpopulationen kamen im Normalfall (= Kontrolle) hier zum Liegen). Ereignisse außerhalb dieses Fensters (stärker granuliert oder kleiner) entsprachen toten oder apoptotischen Zellen oder auch Zellschrott. Die durch die multimerisierten bispezifischen Aptamere vermittelte zytolytische Aktivität wurde über den Anteil der Ereignisse im Fenster R1 bezogen auf die Gesamtzahl der Ereignisse beschrieben. In Abbildung 4.29 sind exemplarisch die durchflusszytometrischen Daten eines Versuchs (a) sowie die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen samt Standardabweichung in Form von Histogrammen dargestellt (b). Die Durchführung eines zweiseitigen Mann-Whitney-Tests zeigte, dass sich das Ergebnis des bispezifischen multivalenten Aptamers TD05 + Sgc8c signifikant von jedem Kontrollergebnis unterscheidet.

## (a) Exemplarische Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse verbrückter Zellen



## (b) Statistische Auswertung dreier unabhängiger Experimente

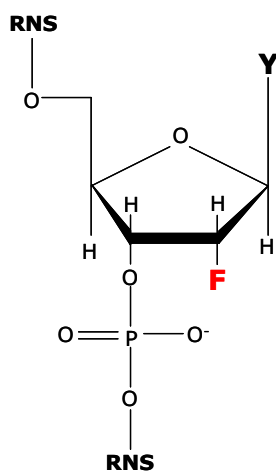


**Abb. 4.29: Durchflusszytometrische Analysen zur Beschreibung der zytolytischen Aktivität des bispezifischen multimerisierten Aptamers (TD05 / Sgc8c).** Ramos-Zellen wurden mit einem FITC-konjugiertem anti-CD20-Antikörper, Jurkat-Zellen mit einem PE-konjugiertem anti-CD3-Antikörper markiert und über multimerisierte bispezifische Aptamere miteinander verbrückt. Die Multimerisierung der biotinylierten DNS-Modellaptamere TD05 (Ramos) und Sgc8c (Jurkat) erfolgte mithilfe von Dynabeads® Streptavidin. Kontrollen wurden mit dem unspezifischen multimerisierten Aptamer C10scr, mit dem multimerisierten Ramos-Aptamer TD05 sowie mit einer Kombination aus TD05 und C10scr angesetzt. Nach Inkubation der Zellen samt multimerisierten Aptameren für 60 min bei RT wurden die Zellen durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer Viabilität (% Zellen im Fenster R1) untersucht (a). Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt und statistisch ausgewertet (b). Die Balken geben den Mittelwert der drei unabhängigen Experimente mit Standardabweichung wieder. \* Die Durchführung eines Mann-Whitney-Test (zweiseitig) zeigt, dass sich das Ergebnis des bispezifischen multimerisierten Aptamers (TD05 / Sgc8c) von jedem Kontrollergebnis signifikant unterscheidet ( $p < 0,05$ ).

## 4.6 Molekulare Charakterisierung der 2'-Fluoro-RNS-Aptamere

Inzwischen waren innerhalb der Gruppe 2'-Fluoro-Pyrimidin stabilisierte RNS-Aptamere gegen lösliches humanes rekombinant hergestelltes CD40L der Firma PeproTech anhand einer TiS-SELEX (TiS = „Target in Solution“, d.h. das Zielprotein wurde hier für die Selektion biotinyliert und für die Separation auf Dynabeads® M280-Streptavidin immobilisiert) mit neun Runden selektiert worden. Das Prinzip der SELEX ist unter 1.4.2 beschrieben. Ausgang war eine synthetische ssDNS-Startbibliothek, die als Transkriptionsschablone für die Herstellung einer RNS-Bibliothek diente. Durch den Einbau eines 5'-Primers mit Promotorsequenz für die anschließende *in vitro* Transkription entstand die RNS-Bibliothek N47Ny mit einer zufälligen Basenabfolge von 47 Nukleotiden, flankiert von definierten Primersequenzen (23 bzw. 22 Nukleotide lang, Primer: 5'-P1.45, 3'-P1.20). Die Selektion erfolgte bei 37 °C in Selektionspuffer (PBS, supplementiert auf final 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µg/µl Heparin, 1 µg/µl BSA).

RNS-Aptamere haben ebenso wie DNS-Aptamere durch die Ausbildung von intramolekularen Basenpaarungen die Fähigkeit, sich zu thermisch stabilen dreidimensionalen Strukturen zu falten. Auch im Bezug auf Bindungsspezifität und Affinität gibt es keine nennenswerten Unterschiede. Allerdings sind die möglichen dreidimensionalen Strukturen diverser, die RNS-Moleküle ausbilden können. Dazu kommt, dass die im Serum sehr instabilen natürlichen RNS-Moleküle durch den Einbau modifizierter Pyrimidinbasen (2'-Amino-, 2'-Fluoro- oder 2'-Bromo-Reste, siehe Abbildung 4.30) nahezu resistent gegen Nukleasen werden (Kubik et al., 1997; Picken et al., 1991).

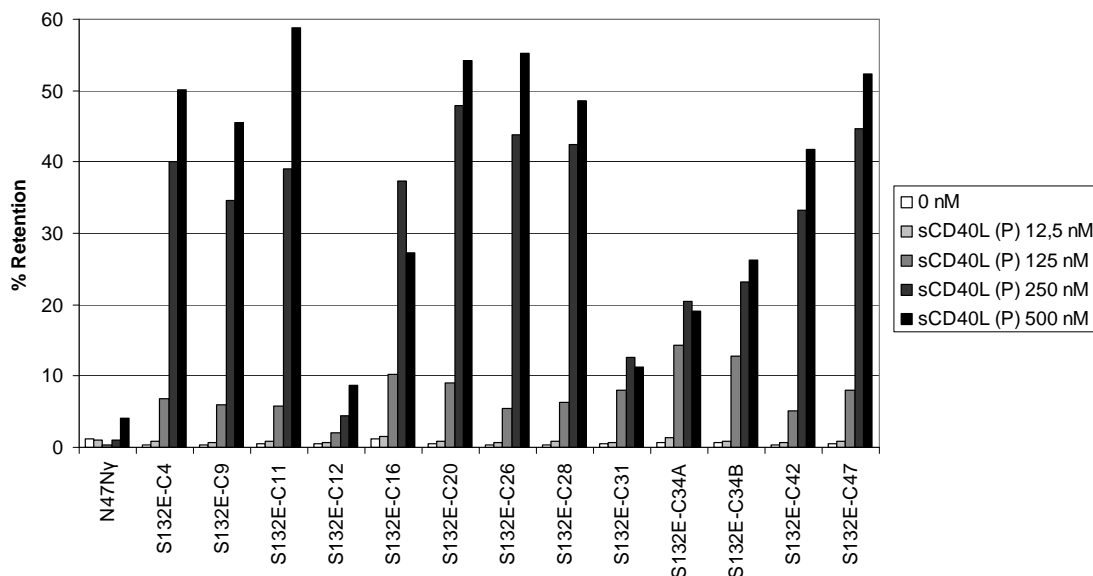


**Abb. 4.30: RNS-Oligonukleotid mit 2'-Fluoro modifiziertem Pyrimidinnukleotid.** Durch den Einbau von Pyrimidinbasen, deren 2'-OH-Gruppe durch ein Fluor-Atom ersetzt ist, werden die natürlicherweise instabilen RNS-Moleküle resistenter gegen Nukleasen (Y= Pyrimidinnukleobase Uracil oder Cytosin; F = Fluor-Atom).

In Analogie zu den DNS-Aptameren sollten auch die 13 identifizierten RNS-Aptamerklone im Rahmen dieser Arbeit auf molekularer Ebene charakterisiert werden. Dafür wurden die RNS-Aptamere radioaktiv markiert und in Filterbindungsanalysen auf ihre Bindung gegen unterschiedliche kommerziell erhältliche Formen von CD40L sowie unter verschiedenen Inkubationsbedingungen getestet. Außerdem wurde die Affinität der interessantesten Aptamerklone an lösliches CD40L im Filterbindungsansatz bestimmt. Vor dem Hintergrund, dass die bisher selektierten und ausführlich charakterisierten CD40L-spezifischen DNS-Aptamere keine Kreuzreaktivität mit dem rekombinanten löslichen CD40L der Maus gezeigt haben, war zudem besonders interessant, ob die selektierten RNS-Aptamere auch eine Bindung an das sCD40L der Maus zeigen. Das könnte eine präklinische Validierung interessanter Aptamere stark erleichtern.

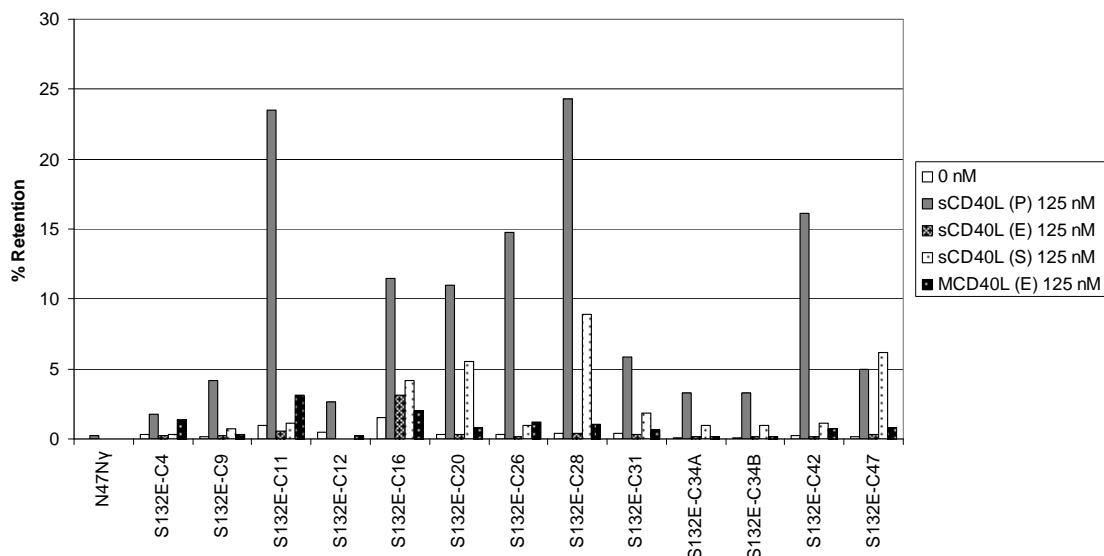
#### **4.6.1 Bindung der RNS-Aptamere an verschiedene Formen von CD40L**

Wie schon die DNS-Aptamere sollten auch die 2'-Fluoro-RNS-Aptamere im ersten Schritt gegen verschiedene kommerziell erhältliche rekombinante Formen des immunologischen Schlüsselmoleküls CD40-Ligand in Filterbindungsanalysen (siehe 3.1.8) auf molekularer Ebene charakterisiert werden. Insgesamt wurden 13 verschiedene Klone (S132E-C4, -C9, -C11, -C12, -C16, -C20, -C26, -C28, -C31, -C34A, C34B, -C42 und -C47), sowie die Startbibliothek N47Ny als Negativkontrolle untersucht. Die verschiedenen Sequenzen wurden zur radioaktiven Markierung unter der Verwendung von  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-GTP in vitro transkribiert (siehe 3.1.7.2) und zunächst auf ihre Bindung gegen lösliches CD40L der Firma PeproTech (= Zielprotein der Selektion) in Selektionspuffer (siehe 2.8) getestet. sCD40L (P) wurde in Konzentrationen von 0 bis 500 nM eingesetzt. Die absoluten Werte wurden mit den 100 %-Werten verrechnet, um die Retentionswerte zu erhalten. Wie in Abbildung 4.31 dargestellt, zeigten alle untersuchten RNS-Aptamerklone eine Bindung an sCD40L (P), verglichen mit der Negativkontrolle N47Ny. Während die Bindung des Klons S132E-C12 am schwächsten ausfiel, zeigten gleich mehrere Klone eine starke Bindung an das Zielprotein (S132E-C4, -C9, -C11, -C20, -C26, -C28, -C42 und -C47).



**Abb. 4.31: Bindungsreihe der 2'-Fluoro-RNS-Aptamere gegen lösliches CD40-Ligand der Firma PeproTech.** Die RNS-Aptamerklone (132E-C4, -C9 usw.) wurden unter der Verwendung von radioaktiv markierten GTP-Nukleotiden in vitro transkribiert und in einer Filterbindungsanalyse auf ihre Bindung an verschiedene Konzentrationen von löslichem CD40L der Firma PeproTech getestet (0, 12,5, 125, 250 und 500 nM). Als Kontrolle wurde die Startbibliothek N47Ny verwendet. Das Balkendiagramm stellt die Retentionswerte in % dar.

In Analogie zu den Untersuchungen der DNS-Aptamere wurden auch die verschiedenen 2'-Fluoro-RNS-Klone hinsichtlich ihrer Kreuzreaktivität gegen weitere kommerziell erhältliche Formen von CD40L (siehe Tabelle 4.1) abgefragt. Dafür wurde die Bindung gegen je 125 nM lösliches CD40L von PeproTech (P), Sigma-Aldrich (S) und ENZO Life Sciences (E) (erhältlich in einem Set mit Verstärkermolekül „Enhancer“ für Liganden) sowie gegen 125 nM *MegaCD40L*<sup>TM</sup> (Konstrukt aus zwei CD40L-Trimeren von ENZO Life Sciences, MCD40L (E)) in Selektionspuffer (siehe 2.8) untersucht. Auch hier wurde als Negativkontrolle die Startbibliothek der Selektion verwendet (N47Ny). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.32 dargestellt. Wie zu sehen ist, konnte nur teilweise eine schwache Kreuzreaktivität gegen *MegaCD40L*<sup>TM</sup> gefunden werden. Die lösliche CD40L Form von Sigma-Aldrich wurde von den Klonen S132E-C16, -C20, -C28 und -C47 erkannt. Allerdings zeigte nur der Klon C47 eine Bindung, die mit der an sCD40L von PeproTech vergleichbar ist. An das CD40L-Produkt von ENZO Life Sciences konnte nur eine Bindung des Klons C16 beobachtet werden. Aber auch diese Bindung war deutlich schlechter als die an das Zielprotein der Selektion von PeproTech. Besonders auffallend zeigte sich auch hier die starke Bindung der Klone S132E-C11, -C26, -C28, und -C42 an sCD40L (P). Es konnte bestätigt werden, dass der Klon S132E-C12 eine nur schwache Bindung an sCD40L der Firma PeproTech erkennen lässt.



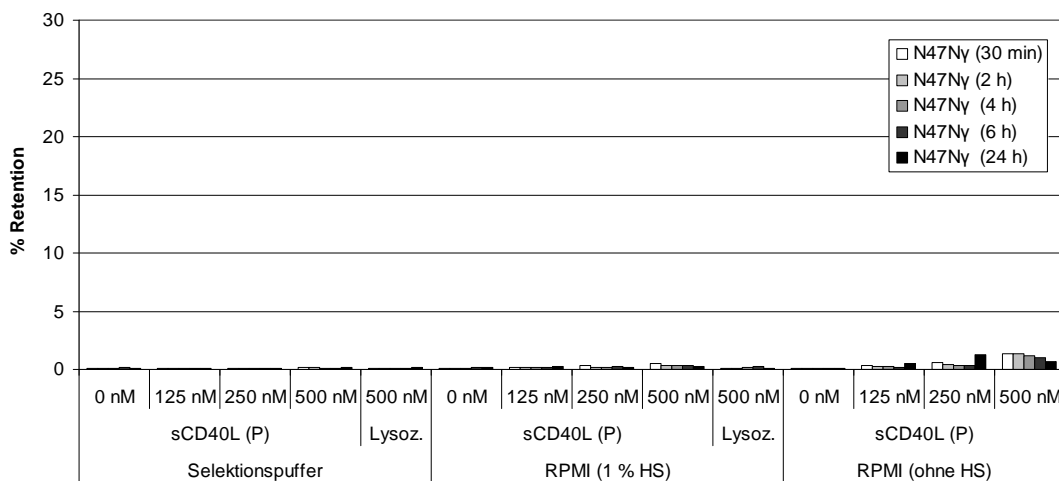
**Abb. 4.32: Bindung der 2'-Fluoro-RNS-Aptamerklone an verschiedene kommerziell erhältliche Formen von CD40-Ligand.** Die RNS-Aptamerklone (132E-C4, -C9 usw.) wurden unter der Verwendung von radioaktiv markierten GTP-Nukleotiden in vitro transkribiert und in einer Filterbindungsanalyse auf ihre Bindung an verschiedene Formen von CD40L (je 125 nM) getestet. Als Kontrolle wurde die Startbibliothek N47Ny verwendet. Das Balkendiagramm stellt die Retentionswerte in % dar.

#### 4.6.2 Bindung der RNS-Aptamere in Anwesenheit von Medium mit Humanserum über die Zeit

Während natürliche RNS-Aptamere im Serum nur wenige Minuten stabil sind, soll der Einbau modifizierter Pyrimidinbasen zu nahezu Nuklease-resistenten RNS-Aptameren führen (Kubik et al., 1997; Pieken et al., 1991). Die in dieser Arbeit charakterisierten CD40L-spezifischen RNS-Aptamere waren über den Einbau von 2'-Fluoro-Pyrimidinbasen stabilisiert. In Analogie zu den DNS-Aptameren sollte auch die Stabilität der RNS-Aptamere in Medium mit 1 % Humanserum (HS) untersucht werden. Dafür wurden Filterbindungsanalysen im Selektionspuffer (siehe 2.8), RPMI-Medium und RPMI-Medium versetzt mit 1 % Humanserum über Inkubationszeiträume von 30 min, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h durchgeführt. Die bisher vielversprechenden Aptamerklone S132E-C11, -C26 und -C28 sowie die Startbibliothek N47Ny als Negativkontrolle wurden hinsichtlich ihrer Bindung an steigenden Konzentrationen sCD40L (PeproTech) getestet. Die radioaktive Markierung der RNS-Sequenzen erfolgte durch die Verwendung von  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-GTP in einer in vitro Transkription (siehe 3.1.7.2). Als Kontrolle für die Spezifität wurde zusätzlich die Bindung an 500 nM Lysozym in Selektionspuffer und RPMI mit 1 % HS untersucht. Die absoluten Werte wurden mit

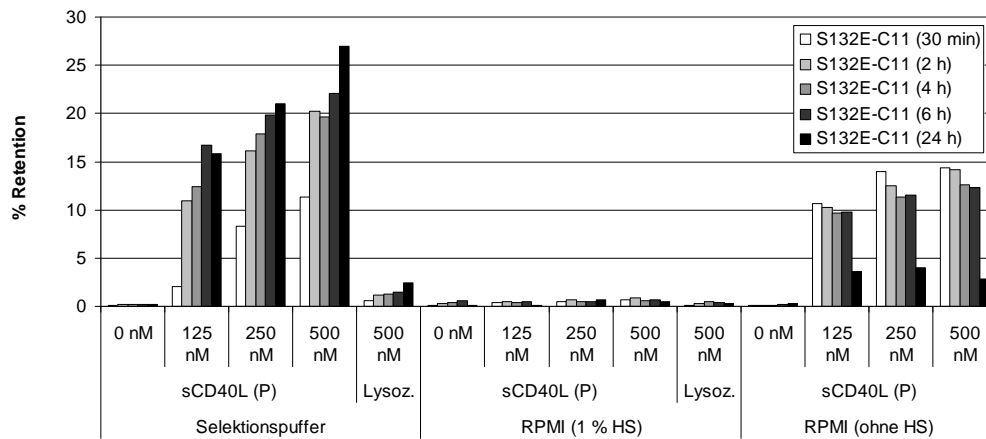
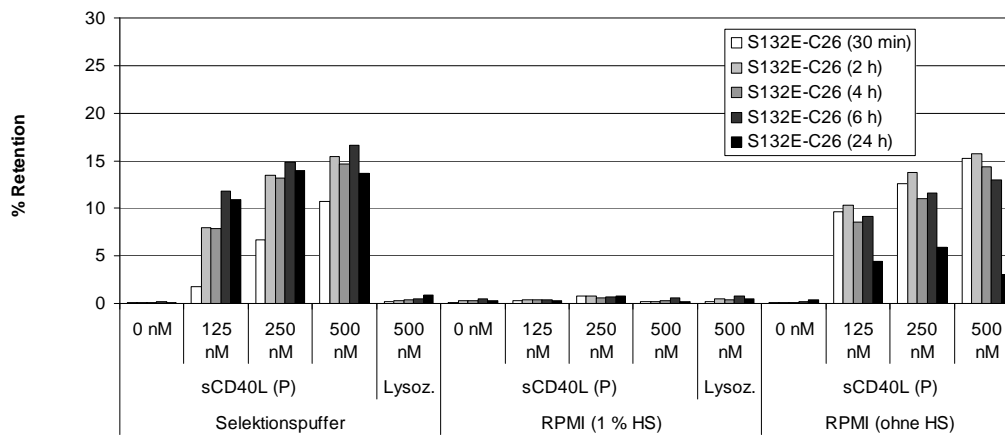
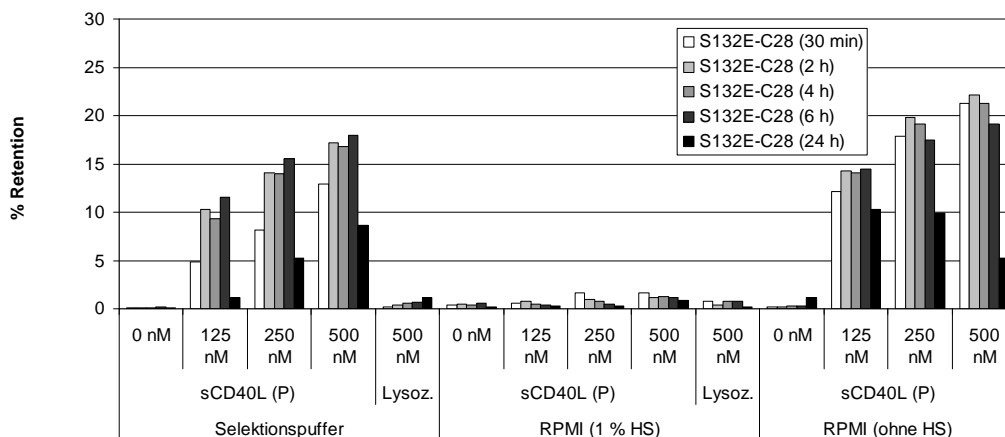
den 100 %-Werten verrechnet, um die Retentionswerte zu erhalten. In den Abbildungen 4.33 und 4.34 sind die Ergebnisse dargestellt.

Es stellte sich heraus, dass die Bindung der RNS-Aptamere sowohl in Selektionspuffer als auch in RPMI (ohne HS) über einen Zeitraum von 6 h vergleichsweise stabil war. Während die Bindung nach 24 h Inkubation in Selektionspuffer immer noch auf entsprechendem Niveau war, schien sie in RPMI (ohne HS) abzunehmen. Besonders auffallend war, dass die Bindung der 2'-Fluoro-RNS-Aptamere schon nach 30 min nahezu komplett einbrach. Die Startbibliothek N47Ny zeigte erwartungsgemäß keine Bindung.



**Abb. 4.33: Bindung der RNS-Bibliothek N47Ny an CD40-Ligand (PeproTech) in Selektionspuffer und RPMI-Medium, (mit 1 % HS und ohne HS) nach verschiedenen Inkubationszeiträumen.** Die RNS-Startbibliothek N47Ny wurde als Kontrolle durch den Einsatz radioaktiv markierter GTP-Nukleotide in einer in vitro Transkription markiert und in einer Filterbindungsanalyse auf die Bindung an lösliches CD40L der Firma PeproTech (0, 125, 250 und 500 nM) in Selektionspuffer und RPMI (mit 1 % HS und ohne HS) getestet. Dabei wurden die Versuchsansätze nach unterschiedlichen Zeiträumen auf den Filter gegeben (30 min, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h). Lysozym wurde als Kontrollprotein in Selektionspuffer und RPMI mit 1 % HS eingesetzt (500 nM). Das Balkendiagramm stellt die Retentionswerte in % dar.

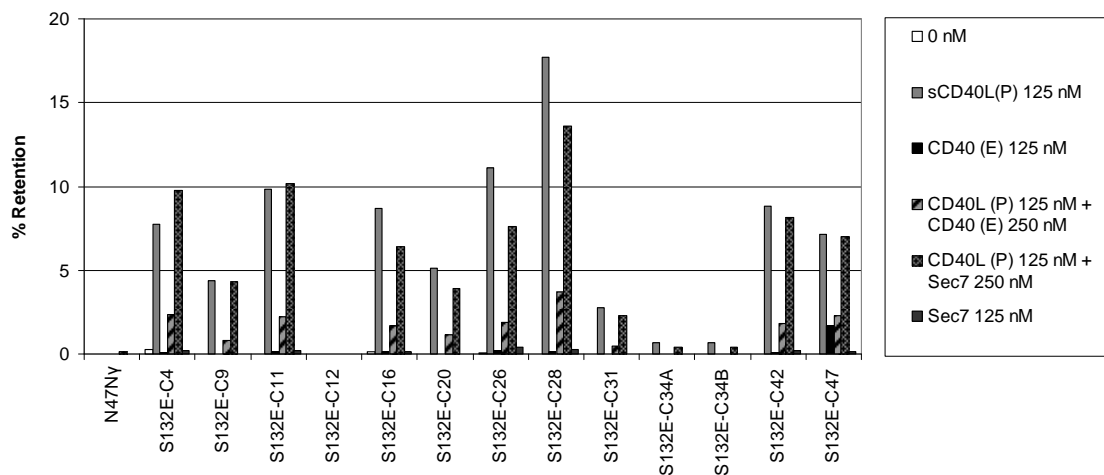


**(a) Stabilität des RNS-Aptamerklons S132E-C11****(b) Stabilität des RNS-Aptamerklons S132E-C26****(c) Stabilität des RNS-Aptamerklons S132E-C28**

**Abb. 4.34: Bindung der RNS-Aptamerklone S132E-C11 (a), S132E-C26 (b) und S132E-C28 (c) an CD40-Ligand (PeproTech) in Selektionspuffer und RPMI-Medium, (mit 1 % HS und ohne HS) nach verschiedenen Inkubationszeiträumen.** Die RNS-Aptamere C11 (a), C26 (b) und C28 (c) wurden durch den Einsatz radioaktiv markierter GTP-Nukleotide in einer in vitro Transkription markiert und in einer Filterbindungsanalyse auf die Bindung an lösliches CD40L der Firma PeproTech (0, 125, 250 und 500 nM) in Selektionspuffer und RPMI (mit 1 % HS und ohne HS) getestet. Dabei wurden die Versuchsansätze nach unterschiedlichen Zeiträumen auf den Filter gegeben (30 min, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h). Lysozym wurde als Kontrollprotein in Selektionspuffer und RPMI mit 1 % HS eingesetzt (500 nM). Die Balkendiagramme stellen die Retentionswerte in % dar.

### 4.6.3 Konkurrenz der RNS-Aptamerbindung durch CD40

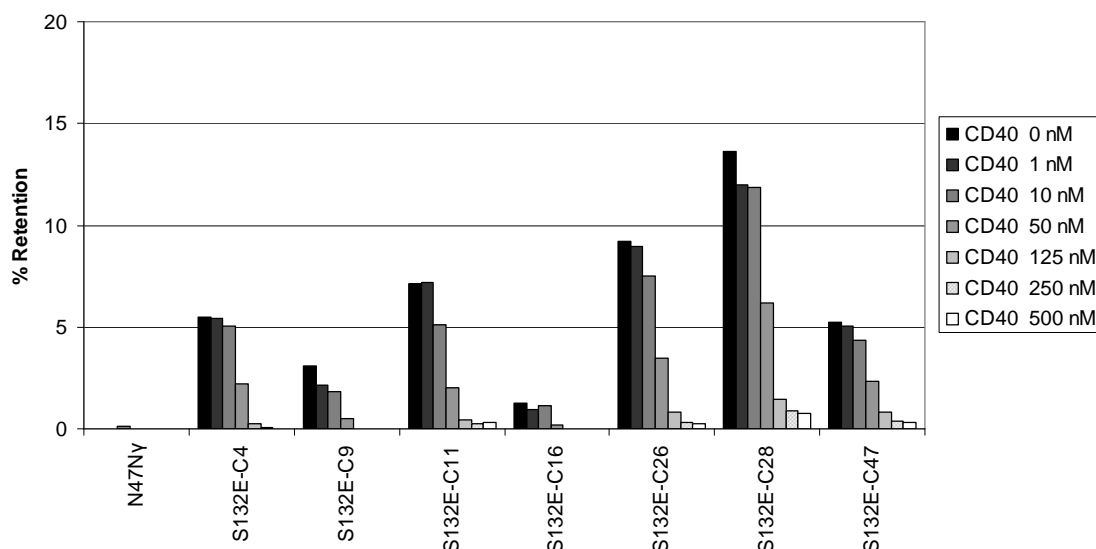
Um einen Hinweis auf die Bindungsregion der 2'-Fluoro-RNS-Aptamere an lösliches CD40L (P) zu erhalten, wurde in Analogie zu den Versuchen der DNS-Aptamere untersucht, ob die Bindung durch die zusätzliche Gabe steigender Konzentrationen des natürlichen Interaktionspartners CD40 (rekombinant, von ENZO Life Sciences) zu kompetitieren ist. Dafür wurden die verschiedenen Sequenzen zur radioaktiven Markierung unter der Verwendung von  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-GTP in vitro transkribiert (siehe 3.1.7.2) und in einem Vorversuch auf ihre Bindung an je 125 nM sCD40L (P), CD40 (E) sowie Sec7 als Negativkontrolle in Selektionspuffer (siehe 2.8) getestet. Sec7 (MW 24,3 kDa) ist durch vergleichsweise viele basische Aminosäuren (Lysin, Arginin und Histidin) auf der Proteinoberfläche ein kritisches Kontrollprotein. Außerdem wurde die Bindung der Klone an 125 nM sCD40L (P) bei der gleichzeitigen Zugabe der doppelten Menge an CD40 bzw. Sec7 (Kontrolle) untersucht. Anhand dieses Vorversuchs sollte das Prinzip des Ansatzes bestätigt werden, bevor eine Analyse im größeren Umfang durchgeführt wurde. Um die Retentionswerte zu erhalten, wurden die absoluten Werte mit den 100 %-Werten verrechnet.



**Abb. 4.35: Vorversuch zur Bindungskompetition der 2'-Fluoro-RNS-Aptamere an lösliches CD40L (PeproTech) durch rekombinantes CD40.** RNS-Aptamerklone (S132E-C4, -C9 usw.) wurden unter der Verwendung von radioaktiv markierten GTP-Nukleotiden in vitro transkribiert und in einer Filterbindungsanalyse auf ihre Bindung an lösliches CD40L der Firma PeproTech (125 nM), an CD40 der Firma ENZO Life Sciences (125 nM) und an Sec7 (Negativkontrolle 125 nM) getestet. Außerdem wurde die Konkurrenz der Bindung an sCD40L durch die Zugabe der doppelten Menge an CD40 und Sec7 (als Kontrolle) untersucht, um das Prinzip des Versuchs für weitere Analysen im größeren Ansatz zu bestätigen. CD40 ist der natürliche Interaktionspartner von CD40L. Als Kontrolle wurde die Startbibliothek N47Ny verwendet. Das Balkendiagramm stellt die Retentionswerte in % dar.

Wie in Abbildung 4.35 dargestellt, war der Versuchsansatz erfolgreich. Eine deutliche Bindung an 125 nM sCD40L (P) konnte bestätigt werden, wobei die gleichen Klone wie in vorhergehenden Versuchen kaum (S132E-C12), schwach (S132E-C31, -C34A und B) oder gut (S132E-C4, -C11, -C26 und -C28) gebunden haben. Erwartungsgemäß wurde keine Bindung an CD40 oder Sec7 detektiert. Durch die Zugabe des natürlichen Interaktionspartners CD40 im doppelten Überschuss (250 nM) konnte die Bindung der Aptamere an CD40L (P) deutlich reduziert werden, während die Zugabe des Kontrollproteins Sec7 die Bindung kaum beeinflusste.

Nachdem im Vorversuch gezeigt wurde, dass der Ansatz an sich funktioniert und die Zugabe des Kontrollproteins keine Wirkung auf das Bindeverhalten hatte, wurde der Versuch in größerem Maßstab mit steigenden Konzentrationen an CD40 wiederholt. Dabei wurde die Bindung von sieben 2'-Fluoro-RNS-Aptamerklonen (S132E-C4, -C9, -C11, -C16, -C26, -C28 und -C47) an 125 nM sCD40L (P) in Selektionspuffer (siehe 2.8) unter der Zugabe steigender Konzentrationen an CD40 (0 bis 500 nM) untersucht. Als Negativkontrolle kam, wie üblich, die Startbibliothek N47Ny zum Einsatz.



**Abb. 4.36: Konkurrenz der Bindung der 2'-Fluoro-RNS-Aptamere an 125 nM lösliches CD40L (PeproTech) durch steigende Konzentrationen an rekombinantem CD40.** RNS-Aptamerklone (132E-C4, -C9 usw.) wurden unter der Verwendung von radioaktiv markierten GTP-Nukleotiden in vitro transkribiert und in einer Filterbindungsanalyse auf ihre Bindung an lösliches CD40L der Firma PeproTech getestet (125 nM). Gleichzeitig wurden steigende Konzentrationen an rekombinantem CD40 (0, 1, 10, 50, 125, 250 und 500 nM) in den Versuchsansatz gegeben, um einen Hinweis auf die Bindungsregion der verschiedenen Aptamerklone zu erhalten. CD40 ist der natürliche Interaktionspartner von CD40L. Als Kontrolle wurde die Startbibliothek N47Ny verwendet. Das Balkendiagramm stellt die Retentionswerte in % dar.

Wie in Abbildung 4.36 dargestellt, konnten vorher erzielte Ergebnisse bestätigt werden. Wiederholt zeigten die Klone S132E-C26 und -C28 eine Starke Bindung an sCD40L (P). Bei allen untersuchten Klonen konnte eine konzentrationsabhängige Kompetition der Bindung an sCD40L (P) beobachtet werden. Auffallend war, dass sich die Bindung aller RNS-Aptamere deutlich stärker kompetitieren ließ, als die DNS-Aptamere (siehe 4.1.3). Daraus ließ sich die Vermutung ableiten, dass der sCD40L-Bereich, an den die untersuchten Aptamere binden, mit dem Interaktionsbereich von CD40 übereinstimmt oder zumindest teilweise überlappt. Außerdem konnte man erahnen, dass die Affinität der RNS-Aptamere schlechter ist, als die der DNS-Aptamere. In Tabelle 4.5 sind die relativen Kompetitionswerte der Aptamerbindung an sCD40L (P) durch steigende Konzentrationen an CD40 (E) zusammengefasst.

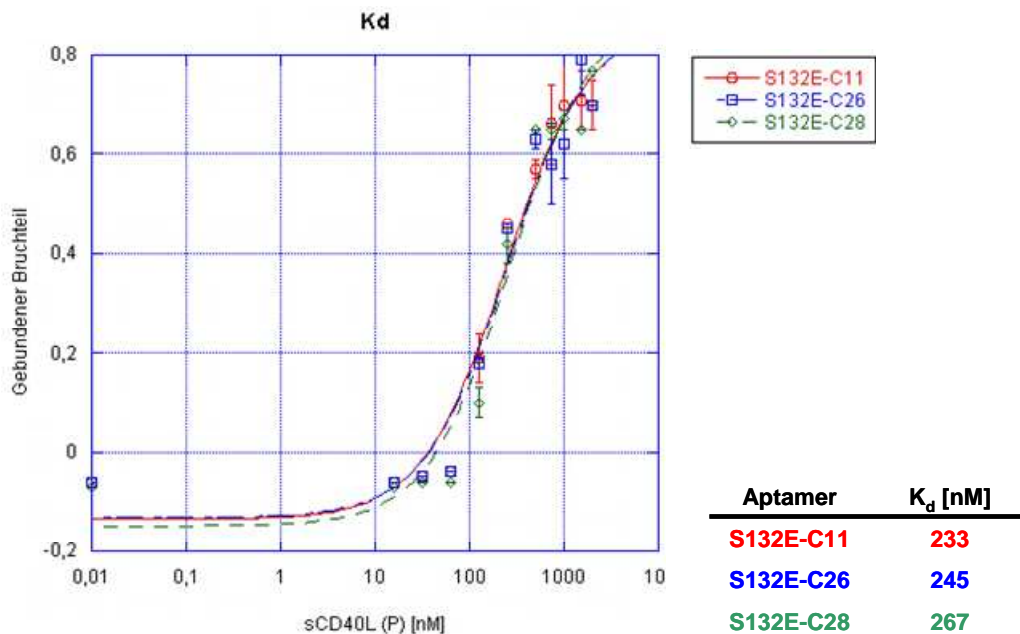
**Tabelle 4.5: Kompetition der RNS-Aptamerbindung an 125 nM lösliches CD40L (PeproTech) durch steigende Konzentrationen an CD40 (ENZO Life Sciences).** Angegeben ist jeweils die relative Abnahme (=Kompetition) der RNS-Aptamerbindung an lösliches CD40L (P) durch die Zugabe von CD40 bezogen auf den Retentionswert der Bindung ohne Zugabe von CD40 (= 100). In grau sind die Werte der Startbibliothek N47Ny und des schlecht bindenden Klons S132E-C16 eingetragen.

	CD40						
	0 nM	1 nM	10 nM	50 nM	125 nM	250 nM	500 nM
N47Ny	100	36	-47	0	27	33	30
S132E-C4	100	98	92	40	4	1	-2
S132E-C9	100	69	59	16	-8	-11	-7
S132E-C11	100	101	72	28	6	4	4
S132E-C16	100	77	93	15	-37	-38	-43
S132E-C26	100	97	81	38	9	4	3
S132E-C28	100	88	87	46	11	6	6
S132E-C47	100	96	83	44	16	7	6

#### 4.6.4 Bestimmung der Dissoziationskonstante

Um das Bindungsverhalten der 2'-Fluoro-RNS-Aptamere besser zu verstehen, war es sehr wichtig, die Affinität an das Zielprotein zu bestimmen. Dafür wurden Bindungskurven der interessanten Aptamere S132E-C11, -C26 und C28 mittels Filterbindungsanalyse in Selektionspuffer (siehe 2.8) aufgenommen. Zur radioaktiven Markierung wurde  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-GTP in eine in vitro Transkription eingesetzt (siehe 3.1.7.2). Lösliches CD40L der Firma PeproTech (= Zielprotein der Selektion) wurde in Konzentrationen von 0 bis 2000 nM eingesetzt. Der Ansatz erfolgte in Duplikaten. Die

absoluten Werte wurden mit den 100 %-Werten verrechnet, um die Retentionswerte zu erhalten. Die in Excel errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der Retentionswerte wurden mithilfe der Software Kaleidagraph 4.0 mit der einfachen Lösung des Massenwirkungsgesetzes angeglichen und in den gebundenen Bruchteil („fraction bound“) umgerechnet.



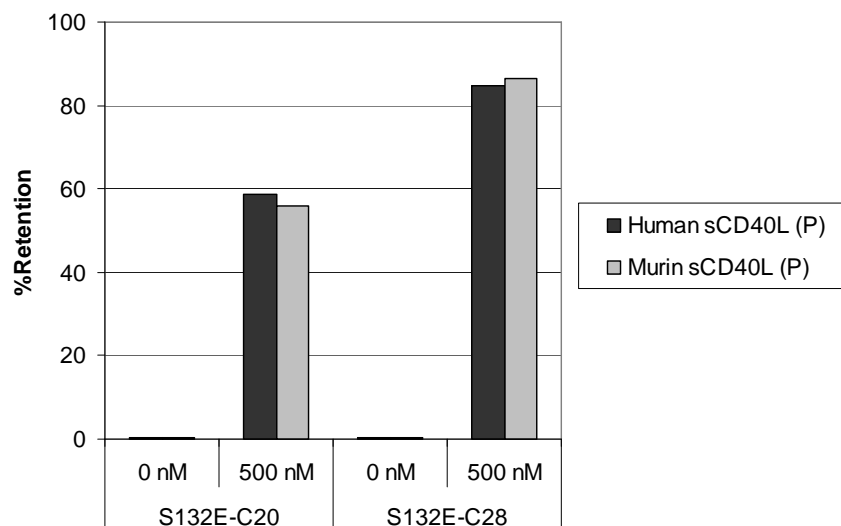
**Abb. 4.37: Ermittlung der Affinität der RNS-Aptamere S132E-C11, -C26 und -C28 an sCD40L mittels Filterbindungsanalyse.** Die RNS-Aptamere S132E-C11, -C26 und -C28 wurden durch den Einsatz von  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-GTP in eine in vitro Transkription radioaktiv markiert und in einer Filterbindungsanalyse auf die Bindung an steigenden Konzentrationen (0 bis 2000 nM) lösliches CD40L der Firma PeproTech getestet. Der Ansatz erfolgte in Duplikaten. Die aus den absoluten und 100 %-Werten errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit der Lösung des Massenwirkungsgesetzes angepasst und in Werte für den gebundenen Bruchteil („fraction bound“) umgerechnet. Die nach dem Massenwirkungsgesetz errechnete  $K_d$  der RNS-Aptamere S132E-C11, -C26 und -C28 (0,5 gebundener Bruchteil) ist mit 233 nM, 245 nM und 267 nM im nanomolaren Bereich.

Die  $K_d$  entspricht dem Wert für „0,5 gebundener Bruchteil“ und lässt sich aus der Bindungskurve leicht ablesen (siehe Abbildung 4.37). Mit einer  $K_d$  der drei RNS-Aptamere von 233 nM, 245 nM und 267 nM kann von einer Affinität im nanomolaren Bereich ausgegangen werden.

#### 4.6.5 Kreuzreaktivität mit dem CD40-Ligand der Maus

Auch die 2'-Fluoro-RNS-Aptamere sollten vor allem im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Einsatz charakterisiert werden. Nachdem die DNS-Aptamere keine Kreuzreaktivität mit dem löslichen CD40L der Maus zeigten, war es besonders wichtig zu untersuchen, ob sich die RNS-Aptamere in diesem Punkt anders verhalten. Eine Kreuzreaktivität zum sCD40L der Maus könnte präklinische Untersuchungen im Maus-Modell stark vereinfachen.

Dafür wurden die bisher vielversprechenden CD40L-spezifischen 2'-Fluoro-RNS-Aptamere S132E-C20 und -C28 zur radioaktiven Markierung unter der Verwendung von  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-GTP in vitro transkribiert (siehe 3.1.7.2) und auf die Bindung an rekombinantes humanes und murines lösliches CD40L (beides von der Firma PeproTech, 0 und 500 nM) in Selektionspuffer (siehe 2.8) getestet. Die absoluten Werte der Filterbindungsanalyse wurden mit den 100 %-Werten verrechnet, um die Retentionswerte zu erhalten. Wie in Abbildung 4.38 dargestellt, konnte eine deutliche Kreuzreaktivität der 2'-Fluoro-RNS-Aptamere S132E-C20 und -C28 mit dem löslichen CD40L der Maus beobachtet werden. Die Bindung an humanes lösliches CD40L war erwartungsgemäß sehr stark.



**Abb. 4.38: Bindung der CD40L-spezifischen 2'-Fluoro-RNS-Aptamere S132E-C20 und -C28 an humanes und murines lösliches CD40-Ligand.** Die RNS-Aptamere S132E-C20 und -C28 wurden durch den Einsatz von  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-GTP in eine in vitro Transkription radioaktiv markiert und in einer Filterbindungsanalyse auf die Bindung an lösliches humanes und murines CD40L der Firma PeproTech getestet (0, und 500 nM). Das Balkendiagramm stellt die Retentionswerte in % dar.

## 5 Diskussion

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation ist in vielen Fällen die einzig kurative Therapie von bösartigen oder auch schwerwiegenden Erberkrankungen des blutbildenden Systems. Im Falle von bösartigen Krankheiten übernehmen dabei übertragene Lymphozyten des Spenders die wichtige Aufgabe, verbleibende leukämische („Graft-versus-Leukemia“, GvL) oder andere entartete Zellen des Empfängers zu zerstören und somit die Rezidivrate zu verringern. Allerdings können genau diese Zellen auch weitere Gewebe des Empfängers als fremd erkennen und angreifen und so zur Entstehung einer gefährlichen Transplantat-Wirt-Reaktion führen („Graft-versus-Host Disease“, GvHD). Die Behandlung dieser lebensbedrohlichen Komplikation erfolgt bis dato mittels Immunsuppressiva. Dadurch lässt sich eine GvHD in der Regel zwar reduzieren, gleichzeitig steigt aber das Infektionsrisiko und auch der positive GvL-Effekt wird abgeschwächt. Insofern sind innovative Behandlungsformen notwendig, die nicht nur die gesamte Lymphozyten-Population supprimieren, sondern gleichzeitig die optimale Ausbildung eines GvL-Effektes ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das therapeutische Potential von Aptameren (einzelnsträngige Nukleinsäure-Liganden) im Zusammenhang mit Komplikationen nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation analysiert werden. Dafür wurden Überlegungen und Untersuchungen zu zwei verschiedenen therapeutischen Ansätzen unternommen.

Eine Möglichkeit ist die Blockade von GvHD-reaktiven Zellen. Dafür wurden Aptamere (DNS und RNS) gegen das immunologische Schlüsselmolekül CD40-Ligand untersucht. CD40L wird transient von T-Zellen nach Antigenkontakt exprimiert. Die Interaktion von CD40L mit CD40, das konstitutiv auf antigenpräsentierenden Zellen zu finden ist, ist ein entscheidendes kostimulatorisches Signal in der Immunantwort. Auch in der Entstehung der GvHD spielt diese Interaktion eine bedeutende Rolle (Durie et al., 1994a).

Eine weitere Möglichkeit ist die Redirektion von Immuneffektorzellen, weg von GvHD-sensitiven Geweben und hin zu leukämischen Zellen. Dieser Ansatz wird zurzeit unter Anwendung bispezifischer Antikörperkonstrukte in einer Reihe klinischer Studien untersucht. Um die verfahrenstechnischen und stoffimmanenten Probleme von Antikörpern zu umgehen, sollten Vorversuche zur Übertragung dieses innovativen Therapieansatzes auf die Stoffklasse der Nukleinsäure-Liganden durchgeführt werden.

## 5.1 Molekulare Charakterisierung vorhandener CD40L-spezifischer DNS-Aptamere

Im ersten Schritt wurden innerhalb der Gruppe selektierte CD40L-spezifische DNS-Aptamere auf molekularer Ebene charakterisiert. Zehn verschiedene Aptamerklone mit einer Länge von 80 Basen wurden dabei hinsichtlich Spezifität, Stabilität, Bindungsbereich, Affinität und der möglichen Verkürzung untersucht, um interessante Klone für weiterführende durchflusszytometrische und funktionale Analysen zu identifizieren.

Interessant war, dass alle zehn DNS-Aptamere dabei ein Bindungsverhalten von sehr hoher Spezifität für humanes rekombinantes lösliches CD40-Ligand (PeproTech) zeigten, dem Zielmolekül der evolutiven in vitro Selektion. Schon kleinste Unterschiede im Zielprotein führten zu starkem oder sogar komplettem Bindungsverlust (vgl. Abbildung 4.2). Auch an das lösliche CD40L der Firma Sigma konnte nur eine sehr schwache Bindung beobachtet werden, obwohl laut Herstellerangaben keine Unterschiede zu dem Produkt der Firma Peprotech vorhanden sind (siehe Tabelle 4.1). Als einziges der zehn DNS-Aptamere zeigte S51A-C10 eine vergleichbare Bindung an ein weiteres, kommerziell erhältliches lösliches monomeres CD40L (ENZO Life Sciences, erhältlich in einem Set mit Verstärkermolekül „Enhancer“ für Liganden). Kein DNS-Aptamer zeigte eine Bindung an ein hexameres CD40L-Produkt (vgl. Abbildungen 4.2 und 4.3). Lösliches monomeres CD40L reicht allein nicht zur in vitro Stimulation von B-Zellen aus. Nur in multimerisierter Form (z. B. als Tetramer oder Hexamer) oder in Kombination mit dem Verstärkermolekül für Liganden ist eine effektive B-Zell-Stimulation zu beobachten. Da ein wichtiges Ziel dieser Arbeit die Identifizierung eines Aptamers war, das auch in zellulären Untersuchungssystemen hinsichtlich seiner Funktionalität untersucht werden kann, waren diese Ergebnisse von großer Bedeutung. Auch die fehlende Kreuzreaktivität mit dem rekombinanten sCD40L der Maus (PeproTech) zeigte einmal mehr die hohe Spezifität der Aptamere (vgl. Abbildung 4.10). Während die außergewöhnliche Spezifität hier im Hinblick auf die präklinische Validierung der CD40L-DNS-Aptamere im zellulären System und im Tiermodell einen Nachteil darstellt, kann eine hohe Spezifität in anderen Zusammenhängen durchaus ein Vorteil sein. Aptamere binden sehr konformationsabhängig, im Gegensatz zu Antikörpern, die vor allem lineare exponierte Epitope erkennen. Dadurch können Aptamere auch gezielt so selektiert werden, dass nur eine bestimmte Konformation des Zielproteins gebunden wird. Beispielsweise in entzündeten Geweben steigt nicht nur die Temperatur, sondern zudem wird der pH-



Wert azidisch (Steen et al., 1995). Das kann vor allem durch die Protonierung von Histidinresten in Proteinen zu konformellen Änderungen führen (Grimsley et al., 2009; Pace et al., 2009). Da bei einer in vitro Selektion alle Bedingungen entsprechend des späteren Einsatzgebietes angepasst werden können, ist es möglich Aptamere zu identifizieren, die beispielsweise nur in entzündeten Geweben an ihr Zielprotein binden.

Überraschend waren die Ergebnisse der Filterbindungsanalysen zur Stabilität der DNS-Aptamere in RPMI-Medium, auch in Gegenwart von 1 % Humanserum, über einen Zeitraum von 24 h (vgl. Abbildungen 4.4, und 4.5). Während das bislang interessante Aptamer S51A-C15 Puffer-unabhängig keine stabile Bindung an das Zielprotein zeigte, war das Aptamer S51A-C10 über 24 h vergleichsweise stabil. Dadurch qualifizierte sich das Aptamer gegenüber den anderen Klonen für einen möglichen therapeutischen Einsatz. Die erhöhten Retentionswerte in RPMI und in Gegenwart von 1 % Humanserum, die sowohl die Aptamere als auch die Startbibliothek D40 in den Kontrollansätzen (Negativkontrolle und Kontrollprotein) zeigten, sind durch ladungsabhängige unspezifische Bindungen an Medium- oder Serumbestandteile zu interpretieren. Die zusätzliche Gabe von unmarkierten Nukleinsäuren (z. B. Lachssperma-DNS) in den Bindungsansatz, bzw. von Heparin in der therapeutischen Anwendung, sollte diesen Effekt verringern können. Da die Aptamere auch im zellulären System untersucht werden sollten und vor allem im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Einsatz, sind die überraschend vielversprechenden Daten von großer Bedeutung. Der Stabilitätsunterschied von nur einigen Minuten bis über 24 h verschiedener gleichlanger CD40L-DNS-Aptamere (S51A-C15 und -C10) steht im Einklang mit vergleichbaren Studien und hängt vermutlich mit der dreidimensionalen Struktur der Sequenzen zusammen (Choi et al., 2010; Di Giusto et al., 2006; Shaw et al., 1995).

Ein weiteres wichtiges Ziel im Zusammenhang der molekularen Charakterisierung war die Eingrenzung des Bindungsbereichs der Aptamere an CD40L war. Aptamere adressieren, aufgrund ihrer auf dem Schlüssel-Schloss-Prinzip basierenden Bindung an ihre Zielstruktur, bevorzugt relevante Bindungsbereiche. Auch die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse bestätigen diese Eigenschaft von Aptameren. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung der CD40L-spezifischen Aptamere an sCD40L durch die Zugabe steigender Konzentrationen an CD40, dem natürlichen Interaktionspartner von CD40L, zu kompetitieren ist (vgl. Abbildungen 4.6 und 4.7). Diese vielversprechenden Ergebnisse lieferten einen entscheidenden Hinweis, dass der Bindungsbereich der DNS-Aptamere an sCD40L mit dem Interaktionsbereich von CD40 übereinstimmt oder

zumindest teilweise überlappt. Einzig Aptamere mit diesem Bindungsverhalten können auch das Potential aufweisen, die Interaktion von CD40L und CD40 zu stören und dadurch die B-Zell-Stimulation über CD40L zu inhibieren.

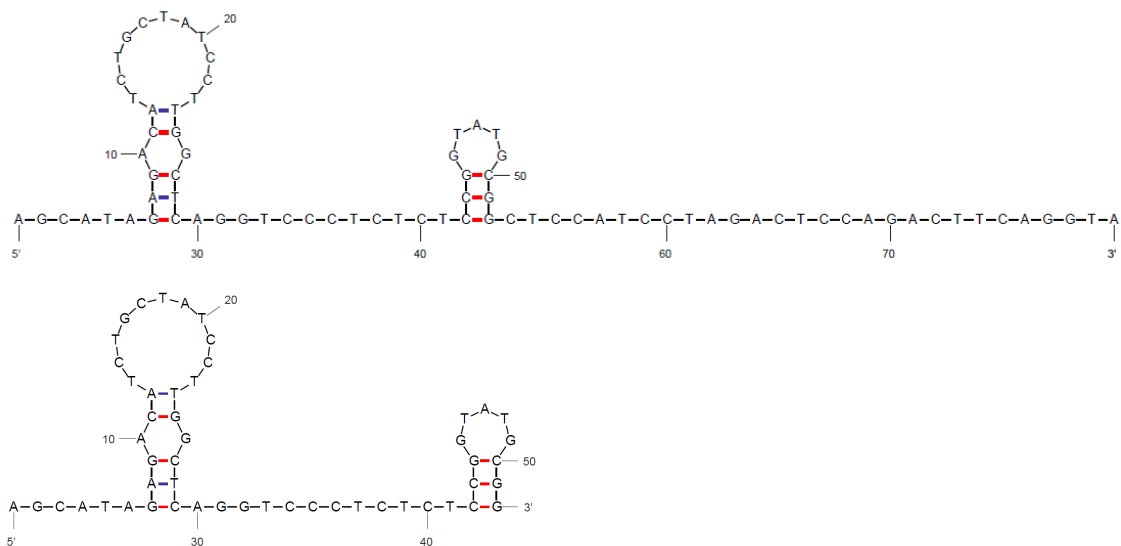
Die Charakterisierung der Affinität im Rahmen von Filterbindungsanalysen zeigte eine  $K_d$  im niedrigen nanomolaren Bereich (2,3 nM) für das funktional interessante Aptamer S51A-C10 (vgl. Abbildung 4.8), welche mit der  $K_d$  des humanisierten anti-CD40L-Antikörpers Idec (5,6 nM) vergleichbar ist (Brams et al., 2001). Im Hinblick auf eine mögliche klinische Applikation der Aptamere wurden, mittels des neuartigen Verfahrens der optisch erzeugten Thermophorese, weiterführende Affinitätsstudien des Aptamers S51A-C10 durchgeführt. Diese robuste und schnelle Methode bietet den Vorteil, innerhalb weniger Sekunden die Bindung von Aptameren an eine Zielstruktur auch in Serum oder Blut, d.h. in physiologischen Bedingungen, zu quantifizieren, wobei nur eine einzige positionsunspezifische Farbstoffmarkierung erforderlich ist (Duhr & Braun, 2006; Iacopini & Piazza, 2003; Reineck et al., 2010). Dabei wird der Effekt genutzt, dass sich die Bewegung von Molekülen in Temperaturgradienten durch die Bindung an ein anderes Molekül verändert. Hier wurde das S51A-C10 Aptamer am 5'-Ende mit einem HEG-Baustein als Abstandhalter mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert. Die Untersuchungen mittels Thermophorese ergaben geringere Affinitäten als in den vorangegangenen Filterbindungsanalysen (vgl. Abbildung 4.9). In PBS-Puffer (1,5 mM  $MgCl_2$ ) war die Bindung mit einer  $K_d$  von 380 nM im nanomolaren Bereich, in 50 % Humanserum und 50 % Vollblut nur im niedrig mikromolaren Bereich (1,1  $\mu M$  bzw. 1,6  $\mu M$ ). Die später durchflusszytometrisch generierten Ergebnisse legen nahe, dass die Länge des Abstandhalters zwischen Sequenz und Markierung das Bindungsverhalten der Aptamere stark beeinflussen kann (siehe 5.2, Seite 141).

Die Möglichkeit einer kosteneffizienten Herstellung ist, auch im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Einsatz der Aptamere, ein besonders wichtiger Aspekt. Die Ausbeute im Rahmen der chemischen Synthese von ssDNS lässt stark nach, je länger die zu synthetisierende Sequenz ist, und kosten- und zeitaufwendige Aufreinigungsverfahren werden notwendig (z. B. PAGE oder HPLC). Es ist somit wichtig, vergleichsweise kurze Aptamere zu entwickeln. Das parentale Volllängen-Aptamer S51A-C10 hat eine Länge von 80 Basen. Schon ab einer Länge von 75 Basen entsteht innerhalb der chemischen Synthese durchschnittlich weniger Volllängenprodukt als unfertige, kürzere Sequenzen (siehe Tabelle 5.1).

**Tabelle 5.1: Prozentuale Ausbeute an Vollängen-Produkt in Abhängigkeit der Sequenzlänge im Rahmen der chemischen Synthese.** (Tabelle adaptiert von „DNA Core Facility“, University of Iowa, <http://dna-9.int-med.uiowa.edu/?q=node/49>)

Sequenzlänge (Basenzahl)	Vollängen- Produkt (%)	Synthese- Fehler (%)
10	91	9
20	83	17
50	61	39
75	48	52
100	37	63

Das durchweg interessante CD40L-Aptamer S51A-C10 konnte im Rahmen dieser Arbeit am 3'-Ende um 28 Basen auf eine Länge von nunmehr 52 Basen ohne Bindungsverlust verkürzt werden. Eine Verkürzung vom 5'-Ende war dagegen nicht möglich (vgl. Abbildung 4.11). In Abbildung 5.1 sind Faltungsvorschläge des parentalen Vollängen-Aptamers S51A-C10 und des verkürzten Aptamers C10-28 nach dem Algorithmus von M. Zuker dargestellt (Zuker, 2003).



**Abb. 5.1: Vorschlag für die Faltung des Vollängen-Aptamers S51A-C10 (oben) und des verkürzten Aptamers C10-28 (unten) nach M. Zuker.** Mithilfe von Mfold wurden die wahrscheinlichsten Faltungsmöglichkeiten des Vollängen-Aptamers S51A-C10 und der verkürzten Variante C10-28 bei 37 °C dargestellt. Die gezeigten Faltungen besaßen mit  $dG = -4,82$  (S51A-C10) und  $dG = -4,5$  (C10-28) die geringsten Werte für die normalisierte Energie. Diese ist durch den Quotienten der freien Energie  $E$  und der Länge der Sequenz (Anzahl der Basen) definiert. Mfold nach <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold> (Zuker, 2003).

## 5.2 Durchflusszytometrische Bindungsdaten der DNS-Aptamere

Nach den Analysen auf molekularer Ebene wurden die interessanten DNS-Aptamere S51A-C10 sowie die verkürzte Variante C10-28 in weiterführenden durchflusszytometrischen Untersuchungen charakterisiert. Da CD40-Ligand auf der Oberfläche stimulierter T-Zellen als Homotrimer vorliegt und Vorversuche eher mäßige Bindungsdaten des monomeren Aptamers an das zelluläre Zielprotein lieferten, wurde untersucht, ob sich die Bindungseigenschaften durch die Multimerisierung von Aptameren und den dadurch entstehenden Aviditätseffekt verbessern lassen (Hasegawa et al., 2008; Karpusas et al., 1995; Peitsch & Jongeneel, 1993). Eine schnelle Möglichkeit diesen Effekt in vitro zu untersuchen, war die Bindung von vier biotinylierten Aptameren an ein Streptavidinmolekül (Tetramerisierung). Für eine klinische Applikation muss allerdings über Alternativen nachgedacht werden, da sich Streptavidin stark in der Niere ablagert (Schechter et al., 1990). Um jedoch prinzipiell die Vorteile einer Multimerisierung zu belegen, wurde im Rahmen von Machbarkeitsversuchen das einfache Biotin-Streptavidin-System genutzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass das freie Biotin in RPMI (820 nM) keinen Einfluss auf die Tetramerisierung über einen Zeitraum von 4 h hat. Die Verwendung von biotinhaltigem Medium war eine wichtige Voraussetzung für spätere Versuche im zellulären System, da Biotin ein essentieller Bestandteil für die Proliferation von Lymphozyten ist (Zempleni & Mock, 2000). Da die Bindung von Biotin an Streptavidin mit etwa 1 bis 10 fM eine der stärksten bekannten nichtkovalenten biologischen Bindungen ist (Klumb et al., 1998), wären eventuelle Effekte bereits innerhalb eines vergleichsweise kurzen Zeitfensters zu erwarten gewesen, weshalb ein Beobachtungszeitraum von 4 h gewählt wurde.

Im Rahmen der Multimerisierungsuntersuchungen über Biotin / Streptavidin wurden zwischen dem Biotinmolekül einerseits und der Aptamersequenz andererseits Brückenmoleküle (ein oder zwei HEG-Bausteine) eingebracht, um dem Aptamer entsprechende Freiheitsgrade zur Faltung zu gewähren. In systematischen Untersuchungen wurde der Einfluss der Abstandhalter-Länge und Orientierung (3'- oder 5'-Ende) auf das Bindungsverhalten des DNS-Aptamers S51A-C10 sowie der verkürzten Variante C10-28 an CD40L-gekoppelte Dynabeads® M450-Epoxy (Invitrogen™) und an zelluläres CD40L untersucht (vgl. Abbildungen 4.13 und 4.14). Hierbei zeigte sich, dass durch längere HEG-Abstandhalter die Bindungseigenschaften

der tetramerisierten Aptamere wesentlich verbessert werden können. Dabei gilt: Je länger das Aptamer, desto stärker ausgeprägt ist dieser Effekt. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass offensichtlich auch die Orientierung des Aptamers (5'- oder 3'-Ende) im Rahmen der Kopplung an den HEG-Abstandhalter einen wesentlichen Einfluss auf die Bindung an die Zielstruktur nimmt (vgl. Abbildungen 4.13 und 4.14). Im Fall des Aptamers S51A-C10 war die chemische Konjugation von HEG an das 5'-Ende von Vorteil. Je länger der Abstandhalter oder je kürzer das Aptamer, desto geringer waren die beobachteten Bindungsunterschiede. Auch in anderen Aptamer-Studien wurde beschrieben, dass die Markierung von Aptameren über einen Strukturverlust zum Einbruch der Bindung führen kann (Boltz et al., 2011). Die hier erzielten Ergebnisse können gleichsam eine Erklärung für die verschlechterten  $K_d$ -Werte des Aptamers S51A-C10 in thermophoretischen Untersuchungen, verglichen mit den Filterbindungsdaten, sein. Dafür wurde das Volllängen-Aptamer (80 Basen) am 5'-Ende mit nur einem HEG-Baustein als Abstandhalter mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert. Es ist somit zu erwarten, dass durch die Verwendung des verkürzten Aptamers C10-28 und der Fluoreszenzmarkierung über einen verlängerten Abstandhalter (z. B. zwei HEG-Bausteine) die  $K_d$ -Bestimmung mittels Thermophorese deutlich verbesserte Ergebnisse liefert.

Nachdem die Bindung des Aptamers S51A-C10 an lösliches CD40L (PeproTech) laut Filterbindungsanalysen über einen Zeitraum von 24 h vergleichsweise stabil war, wurde auch durchflusszytometrisch die Stabilität der Aptamere untersucht. Während die Stabilität im Inkubationspuffer über 18 h erwartungsgemäß sehr gut war, überraschten die Aptamere mit ihrer vergleichsweise stabilen Bindung an CD40L-gekoppelte Dynabeads® M450-Epoxy (Invitrogen™) in RPMI und auch in Gegenwart von 1 % Humanserum (vgl. Abbildung 4.15). Wie schon in Filterbindungsanalysen zeigte sich auch hier in Medium eine leicht erhöhte unspezifische Bindung. Sehr interessant waren auch die Ergebnisse zur Stabilität der Aptamere je nach An- oder Abwesenheit der Zielstruktur. Generell konnte gezeigt werden, dass das Aptamer durch die Bindung an die Zielstruktur, ähnlich wie bei einem „Rnase Protection Assay“ (Ma et al., 1996), vor dem Abbau von Nukleasen geschützt wird (vgl. Abbildung 4.17). Außerdem schützte die chemische Konjugation von Biotin über HEG an das 5'-Ende des DNS-Aptamers vor Degradation und verbesserte dadurch die Stabilität um viele Stunden. Die Biotinylierung am 3'-Ende hingegen hatte keinen Einfluss auf die Stabilität des Aptamers, schon nach 3 h war nur noch eine deutlich schwächere Bindung vorhanden. Dieses Ergebnis war im ersten Moment überraschend, da die 3'-Nuklease-Aktivität in Serum stärker ist, als die 5'-Nuklease-Aktivität, wohingegen die

Aktivität von Endonukleasen in Serum vernachlässigbar zu sein scheint (Boado & Pardridge, 1992; Holt et al., 1988; Tidd & Wahrenius, 1989). Somit wäre es naheliegend, dass vor allem das 3'-Ende vor Abbau geschützt werden sollte. Im Hinblick auf die Daten zur Verkürzung des Aptamers S51A-C10 erscheinen die Ergebnisse allerdings doch stimmig. So führt eine Verkürzung vom 5'-Ende her zum sofortigen Bindungseinbruch, während vom 3'-Ende her 30 Nukleotide ohne Bindungsverlust entfernt werden können. Und auch eine weitere Verkürzung am 3'-Ende verringert die Bindung nur. Somit ist es im Fall des Aptamers S51A-C10 und dessen verkürzter Version C10-28 wichtig, das 5'-Ende zu schützen, wohingegen das 3'-Ende frei sein kann. Allgemein ist es von Bedeutung, diesen Aspekt für jedes Aptamer zu bestimmen, da er stark von der Sequenz und somit der Struktur abhängt (Choi et al., 2010; Di Giusto et al., 2006). Die Daten sind insofern bemerkenswert, da es sich bei den DNS-Aptameren um primär nicht stabilisierte, d.h. chemisch nicht modifizierte Nukleinsäuren handelt. Die damit gegebene Möglichkeit einer einfachen und preiswerten chemischen Synthese sowie einer zu erwartenden, fehlenden Keimzelltoxizität der natürlichen Basen, bieten weitere Vorteile für die therapeutische Applikation.

Wie schon in Filterbindungsanalysen gezeigt, bestätigte sich auch in durchflusszytometrischen Untersuchungen die hohe Spezifität der Aptamere. So wurde allgemein beobachtet, dass das Bindungssignal der tetramerisierten Aptamere (S51A-C10 und die verkürzte Variante C10-28) an zelluläres CD40L nicht mit dem des PE-konjugierten anti-CD40L-Antikörpers vergleichbar ist. Das Signal der Aptamere war in jedem Fall geringer als das Antikörpersignal. Außerdem war die Bindung der Aptamere an zelluläres CD40L auf T-Zellen stark von der Stimulationsart abhängig (vgl. Abbildungen 4.18 und 4.19) und CD40L auf der T-Zelllinie Jurkat wurde nur in sehr geringem Maß gebunden (vgl. Abbildung 4.20). Diese Daten legen nahe, dass das Bindungsverhalten der Aptamere stark von der Konformation des zellulären CD40L abhängt. Es wird davon ausgegangen, dass aktivierte T-Zellen und Thrombozyten CD40L-Trimere schon präformiert enthalten, da es nach Aktivierung sehr schnell, innerhalb von Minuten zur Freisetzung von löslichem CD40L kommen kann (Graf et al., 1995; Ludwig et al., 1996; Pietravalle et al., 1996). Im Gegensatz dazu wird vermutet, dass sich bei stimulierten T-Lymphozyten CD40L erst auf der Zelloberfläche zu Trimeren zusammenfügt (in Analogie zu TNF, (Hsu et al., 1997)). Je nach Stimulationsart könnte die CD40L-Expression und Trimerformation auf unterschiedlichen Zeitachsen ablaufen und so die verschiedenen Bindungsdaten der Aptamere erklären. Eine weitere denkbare Hypothese stützt sich auf die Tatsache, dass CD40L, wenn auch nur in geringem Ausmaß, auch von der Oberfläche der T-Zellen abgespalten werden kann

und so zu löslichem CD40L wird (Graf et al., 1995; Ludewig et al., 1996). Es wurden zwei verschiedene Spaltprodukte von 18 kDa und ca. 15 kDa beobachtet (Graf et al., 1992; Pietravalle et al., 1996). Es wäre möglich, dass die Aptamere an einen Bereich von CD40L binden, der abgespalten wird. Somit könnte eine Bindung der Aptamere auf der Oberfläche von T-Zellen nur solange nachgewiesen werden, wie dieser CD40L-Teil vorhanden ist. Der Antikörper hingegen könnte in einem Bereich binden, der auch bei Abspaltung noch auf der Oberfläche zurück bleibt. Wäre diese Hypothese richtig, könnten die Aptamere gezielt nur aktivierte T-Zellen mit funktionalem CD40L auf der Oberfläche adressieren. Auch die schlechten Bindungsdaten an das CD40L auf der Oberfläche von Jurkat-Zellen könnten mit dieser Hypothese erklärt werden. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass CD40L von Jurkat-Zellen eine Mutation enthält, die zum Bindungseinbruch der Aptamere führt. Über eine Mutation von CD40L auf Jurkat-Zellen ist bisher noch nichts bekannt. Generell sind Jurkat-Zellen, wie andere Tumorzellen auch, genetisch instabil und zeichnen sich durch häufige Mutationsereignisse aus. So wurde gezeigt, dass ein Tumor mehr als  $1 \times 10^4$  Mutationen beinhalten kann (Stoler et al., 1999).

### **5.3 Aptamer-basierte Zellseparation**

Zur Charakterisierung und Validierung der interessanten CD40L-spezifischen DNS-Aptamere wurde zudem untersucht, ob sich auf Basis des verkürzten Klons C10-28 eine Magnet-assoziierte Zellseparation CD40L-positiver Zellen durchführen lässt. Generell konnte gezeigt werden, dass die Separation CD40L-positiver Zellen aus humanen PBMCs möglich ist, die über 14 h mit PMA / Ionomycin stimuliert wurden (vgl. Abbildung 4.21). Dabei wurden die besten Ergebnisse erzielt, wenn CD40L-positiv Zellen im ersten Schritt von biotinylierten, über PE-konjugiertes Streptavidin tetramerisierten Aptameren markiert worden waren und im zweiten Schritt die markierten Zellen über anti-PE MicroBeads separiert wurden. Dabei muss festgehalten werden, dass der Zellverlust bei dem bislang nicht weiter optimierten Ansatz sehr hoch war (vgl. Tabelle 4.4). Wie nach den durchflusszytometrischen Analysen zum Bindungsverhalten der Aptamere zu erwarten war, konnten nicht alle CD40L-positiven Zellen, die vom anti-CD40L-Antikörper erkannt werden, mithilfe der Aptamere separiert werden. Bis jetzt wurde noch nicht untersucht, ob sich die selektierten CD40L-positiven Zellen in ihrer Funktion von den nicht selektierten CD40L-positiven Zellen

unterscheiden. Die Zellen wurden bislang nicht weiter charakterisiert, da der Fokus im Rahmen dieser Arbeit auf anderen Schwerpunkten lag. Dieser Fragestellung muss allerdings weiter nachgegangen werden, bevor eine therapeutische Anwendung des DNS-Aptamers C10-28 zur Blockade oder auch, in Kombination mit einem weiteren Aptamer, zur Verbrückung von aktivierten T-Zellen und leukämischen Zellen umgesetzt werden kann. Eine Zellseparation auf Basis von Aptameren ist vor allem deshalb interessant, dass es dadurch möglich erscheint, eine positive Zellseparation durchzuführen, wobei im Gegensatz zu Antikörpern allerdings die Markierung durch die Zugabe von Nukleasen sehr schnell und einfach entfernt werden könnten. Wie die Daten in dieser Arbeit mehrfach belegen, ist die Bindung der Aptamere aber auch unter Serumbedingungen vergleichsweise stabil. Die im Serum enthaltenen Ektonukleasen (Boado & Pardridge, 1992; Tidd & Warenius, 1989) stören eine Bindung der Aptamere nur geringfügig. Eine Möglichkeit wäre, gezielt Endonukleasen zuzugeben. Dadurch sollte es sehr schnell zu einem Strukturverlust der Aptamere kommen. Da die Bindung von Aptameren stark von deren dreidimensionaler Struktur abhängt, kann damit gerechnet werden, dass ein Strukturverlust auch zu sofortigem Bindungseinbruch führt. Dadurch sollte es möglich sein, Zellen zwar positiv zu separieren, durch einen leichten Schritt aber trotzdem unmarkierte Zellen zu erhalten.

## **5.4 Funktionale Analyse der DNS-Aptamere**

Die Interaktion von CD40 und CD40-Ligand spielt bei der Entstehung von humoraler und auch zellvermittelter Immunantwort eine entscheidende Rolle (Durie et al., 1994b; Foy et al., 1996; Noelle, 1996). Diese Eigenschaft führt dazu, dass die Interaktion als vielversprechender Ansatzpunkt für die Behandlung verschiedener Krankheitsbilder untersucht wird. Im Zusammenhang mit Erkrankungen des blutbildenden Systems und der hämatopoetischen Stammzelltransplantation wurde gezeigt, dass durch eine Blockade der CD40-CD40L-Interaktion mit einem monoklonalen anti-CD40L-Antikörper die Entstehung einer GvHD blockiert, sowie eine CD4<sup>+</sup> T-Zell-vermittelte Transplantat-Abstoßung verhindert werden kann (Blazar et al., 1997; Buhlmann et al., 1999; Ito et al., 2001). Auch in präklinischen Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen, Atherosklerose und soliden Organtransplantationen zeigte der Einsatz eines monoklonalen anti-CD40L-Antikörpers positive Effekte (Howard et al., 1999; Kirk et al., 1999; Kover et al., 2000; Schönbeck et al., 2000). In klinischen Studien wurden zwei verschiedene



humanisierte anti-CD40L-Antikörper zur Behandlung verschiedener Autoimmunerkrankungen untersucht (Boumpas et al., 2003; Kalunian et al., 2002; Kuwana et al., 2004). Nachdem allerdings vermehrt thromboembolische Komplikationen in Patienten und auch im Tiermodell auftraten, wurden alle laufenden klinischen Studien abgebrochen (Boumpas et al., 2003; Kawai et al., 2000). Anschließend wurde ausführlich diskutiert, ob die Ursache der thromboembolischen Effekte in der Zielstruktur CD40L liegt. CD40L wird innerhalb von Sekunden auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten exprimiert (Henn et al., 2001). Der Interaktionspartner CD40 hingegen ist konstitutiv auf vaskulärem Endothel zu finden (Schönbeck & Libby, 2001). Die Interaktion von CD40L auf Seite aktivierter Thrombozyten und CD40 auf Endothelzellen spielt im Rahmen der Thrombus-Stabilisierung eine wichtige Rolle (Damas et al., 2004). Daher wäre es eigentlich naheliegend, wenn eine Blockade dieser Interaktion eher zu einer gegenteiligen Reaktion führen würde, wie Allan D. Kirk als Reaktion auf den Artikel von Tatsuo Kawai begründete (Kawai et al., 2000). Weitere Untersuchungen ergeben Hinweise, dass die thromboembolischen Probleme vor allem durch eine Bindung von Fc $\gamma$ -Rezeptoren an den funktionalen Fc-Teil des monoklonalen Antikörpers zustande kommt (Mirabet et al., 2008). Derartige Effekte wurden auch schon bei anderen Antikörpern gegen verschiedene Thrombozyten-Membranproteine beobachtet (De Reys et al., 1993). Versuche mit anti-CD40L-Fab'<sub>2</sub>-Fragmenten (Antikörperkonstrukt ohne funktionalen Fc-Teil) zeigten in vitro keine Thrombozyten-Aggregation (Mirabet et al., 2008). Der Einsatz eines funktionalen CD40L-spezifischen Aptamers hätte in diesem Zusammenhang den Vorteil, keinen funktionalen Fc-Teil zu besitzen und somit die Nachteile der anti-CD40L-Antikörper zu überwinden.

Um das inhibitorische Potential der DNS-Aptamere ermitteln zu können, wurde zunächst eine Reihe von zellbasierten Untersuchungssystemen entwickelt. Periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) oder auch hochaufgereinigte B-Zellen wurden mit löslichem monomerem, hexamerem (*MegaCD40L*<sup>TM</sup>) oder auch mittels Epoxy-Bead-gekoppeltem CD40L stimuliert. Darüber hinaus wurden aktivierte, CD40L-exprimierende T-Zellen zur Stimulation verwendet, um dann nach einer 18-stündigen Stimulationsphase die Aufregulation von CD86 (B7-2) auf den B-Zellen abzufragen (vgl. Abbildung 4.23). Dabei eignete sich das lösliche CD40L im Set mit einem Verstärkermolekül für Liganden besonders gut. Auch vor dem Hintergrund der Aptamer-Bindungsdaten in Filterbindungsanalysen wurde dieses lösliche CD40L als einziges weiteres der kommerziell erhältlichen CD40L-Formen erkannt (vgl. Abbildungen 4.2 und 4.3).

Im Rahmen von vergleichenden Untersuchungen wurde der anti-CD40L-Antikörper (2B7-Klon von E. Kremmer) mit den charakterisierten, über Streptavidin tetramerisierten CD40L-spezifischen DNS-Aptameren auf ihr inhibitorisches Potential hin untersucht. Dabei konnte die stark inhibierende Wirkung des Antikörpers bestätigt werden. Der Antikörper führt in einem Konzentrationsbereich von 25 bis 250 nM zur Inhibition der aktivierungsinduzierten Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 (B7-2) auf das Niveau von unstimulierten B-Zellen (vgl. Abbildungen 4.24 und 4.25). Die über Streptavidin tetramerisierten Aptamere C10-28 (Biotinylierung am 5'- bzw. 3'-Ende) zeigten hingegen nur eine partielle Inhibition der CD86-Expression (vgl. Abbildung 4.25).

Im Hinblick auf eine mögliche klinische Applikation wurde die hier eingesetzte Aptamerkonzentration (10  $\mu$ M Aptamer-Monomer) auf ein Gesamtvolumen von 5 l Blut berechnet, woraus sich 860 mg monomeres Aptamer (52 Basen) ergeben. Auch der hier in einer Konzentration von 250 nM eingesetzte anti-CD40L-Antikörper 2B7 wäre berechnet auf 5 l Blut mit 188 mg im mg-Bereich (ausgehend von einer Antikörpermasse von ca. 150 kDa). Verglichen mit monoklonalen Antikörpern, die derzeit bereits in der Therapie eingesetzt werden, ist der mg-Bereich realistisch. Der monoklonale anti-CD20-Antikörper Rituximab, der mittlerweile zur Standardtherapie niedrig maligner Lymphome gehört, wird beispielsweise in Dosen von 375 bis 500 mg pro m<sup>2</sup> Körperoberfläche verabreicht (Mohrbacher, 2005). Da es sich bei Aptameren aber um eine ganz andere Stoffklasse als bei Antikörpern handelt, sollte die Dosis von Aptameren auch mit Dosen von Nukleinsäure-Therapeutika verglichen werden. Hierzu eignet sich das einzelsträngige DNS-Derivat Defibrotide, das aus Rinderlungen und Schweinemukosen gewonnen wird. Aufgrund der antikoagulatorischen Wirkung wird Defibrotide vor allem in der Therapie der Venenverschlusskrankheit („Veno-occlusive disease“ = VOD) angewandt (Baron et al., 1997). Die dabei eingesetzten Dosen liegen täglich bei 25 bis 40 mg pro kg Körpergewicht und somit deutlich über den berechneten Mengen der Aptamere (Kornblum et al., 2006).

## 5.5 Verbrückung zweier Zellpopulationen über multivalente bispezifische Aptamere

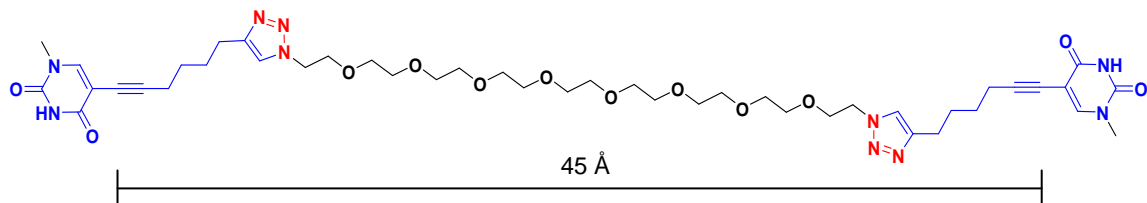
Ein sehr interessanter neuer Therapieansatz von Komplikationen im Zusammenhang mit der hämatopoetischen Stammzelltransplantation ist die Redirektion von Immuneffektorzellen, weg von GvHD-sensitiven Geweben und hin zu leukämischen Zellen über bispezifische Antikörperkonstrukte. Die zum Teil hochpotenten bispezifischen Konstrukte haben den Weg in die Klinik geschafft und werden in einer Vielzahl klinischer Studien geprüft (Bargou et al., 2008; Chames & Baty, 2009b; Xie et al., 2005). Allerdings reichen die Ergebnisse bislang nicht an die Erwartungen heran, da die stoffimmanenten und verfahrenstechnischen Probleme der Antikörper bislang nicht gelöst werden konnten (Chames et al., 2009). Deshalb wurde das klinisch vielversprechende Konzept der Redirektion von Immuneffektorzellen durch Verbrückung von Tumor und Immuneffektorzellen aufgegriffen und konzeptionell die Entwicklung von bispezifischen, multivalenten Aptameren angelegt.

Im Rahmen von Machbarkeitsversuchen wurden die aus der Literatur bekannten und bereits validierten Modellaptamere TD05 sowie Sgc8c verwendet. TD05 bindet an die schwere Kette  $\mu$  von Membran-gebundenem IgM auf Burkitt-Lymphomzellen (z. B. Ramos), während Sgc8c die Protein-Tyrosin-Kinase 7 (PTK 7) auf T-Zell-Lymphom-Zellen (z.B. Jurkat) erkennt (Mallikaratchy et al., 2007; Shangguan et al., 2008). Dadurch konnten wenig zeitintensive und vergleichbare Experimente mit Zelllinien durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Vorversuche waren durchweg hochinteressant und vielversprechend. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten die Verbrückung von Tumor- und Effektorzelllinien (vgl. Abbildung 4.28). Auch die dadurch vermittelte Zellyse konnte anhand durchflusszytometrischer Analysen beobachtet werden (vgl. Abbildung 4.29).

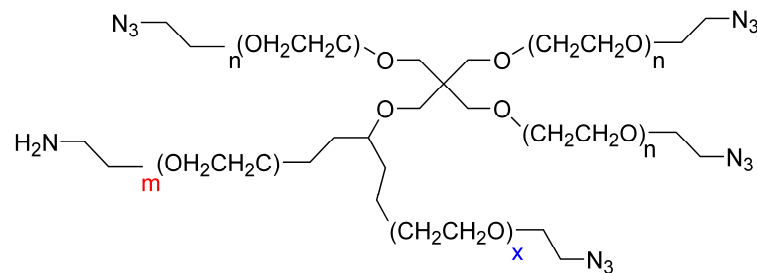
Im Rahmen dieser Vorversuche wurde die Multimerisierung der Aptamere über Biotin / Streptavidin erreicht. Biotinylierte Aptamere wurden dafür an Dynabeads® Streptavidin gekoppelt und so bivalente multimerisierte Aptamere hergestellt. Da dieser Ansatz nicht in vivo umsetzbar ist, wurde über alternative Multimerisierungsstrategien nachgedacht. Sehr interessant erscheint die modulare Verbrückung unterschiedlicher Aptamere über einen PEG-Linker (PEG = Polyethylenglykol). Die Variabilität in Länge und dem Grad der Verzweigung von PEG-Molekülen ermöglicht nicht nur die gezielte Einflussnahme auf die therapeutische Effizienz der entsprechenden Konstrukte,

sondern auch auf die ADME-Tox Eigenschaften (ADME-Tox = Adsorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion und Toxizität). PEG-Linker Moleküle stehen kommerziell zur Verfügung und können entsprechend ihrer Länge sowie Verzweigungsgrad chemisch synthetisiert werden (siehe Abbildung 5.2). Vor diesem Hintergrund ist es notwendig, entsprechende Reaktionsbedingungen zu untersuchen, die durch quantitative chemische Umsetzung eine gerichtete und stufenweise Kopplung von unterschiedlichen Aptameren an Brückenmoleküle ermöglichen.

**(a) Bis-Azid PEG-8 Linkermolekül**



**(b) 5-Arm PEG-Linkermolekül**



**Abb. 5.2: Schematische Darstellung des Bis-Azid PEG-8 (= 45 Å) Linkermoleküls (a) und des 5-Arm PEG-Linkermoleküls (b).** Durch die mögliche Variabilität in Länge und Verzweigungsgrad von PEG-Molekülen können gezielt Abstand (a), Zusammensetzung (b) sowie die ADME-Tox Eigenschaften der entsprechenden bispezifischen Konstrukte beeinflusst werden. Durch m und x sind mögliche Modifikationspositionen angezeigt.

Die Verbrückung von Aptameren mit weiteren Nukleinsäuren wurde bislang erfolgreich zur zielgerichteten Applikation von siRNS (kleine interferierende RNS, engl.: „small interference RNA“) durchgeführt oder um die Gesamtbindungsstärke eines Moleküls (Avidität) zu verbessern (Chu et al., 2006; Santulli-Marotto et al., 2003; Zhou et al., 2009). Im Rahmen diagnostischer Anwendungen ermöglicht die Entwicklung bispezifischer Aptamere die gleichzeitige Erfassung verschiedener Liganden (Tahiri-Alaoui et al., 2002).

Im Zuge einer therapeutischen Anwendung wurde im Juni 2011 von A. Boltz erstmals die Entwicklung bispezifischer Aptamere mit der Eigenschaft eine Lyse von Tumorzellen zu vermitteln beschrieben (Boltz et al., 2011). Dabei wurden Aptamere

selektiert, die spezifisch an CD16 $\alpha$  (Fc $\gamma$ III $\alpha$ -Rezeptor u. a. auf NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen) oder an c-Met (eine Rezeptor-Tyrosinkinase, Tumor-assoziiertes Antigen) binden. Durch die Verknüpfung dieser Aptamere entstanden bispezifische Aptamerkonstrukte, die *in vitro* eine zytolytische Aktivität induzieren konnten, vergleichbar mit der von therapeutischen monoklonalen Antikörpern vermittelten zellulären Zytotoxizität (ADCC = „antibody dependent cellular cytotoxicity“). Das hier beschriebene System ähnelt in seiner Wirkungsweise also weniger den bispezifischen Antikörperkonstrukten als den monovalenten Antikörpern. Die bispezifischen Aptamere dieser Arbeit wurden als gesamte einzelsträngige Oligonukleotide synthetisiert. Die resultierenden Sequenzen waren dementsprechend mit über 100 Basen sehr lang, was eine chemische Synthese erschwert (vgl. Tabelle 5.1) und aufwendige Reinigungsschritte nach sich zieht. Auch die pharmakokinetischen Eigenschaften solcher Konstrukte sind mit einer relativ kurzen Plasmahalbwertszeit ungünstig. Trotz dieser Schwachpunkte ist die Arbeit von A. Boltz ein sehr wichtiger Schritt, der einmal mehr beweist, dass die Stoffklasse der Nukleinsäure-Liganden hochpotent ist und eine Vielzahl interessanter Vorteile für therapeutische Ansätze bietet.

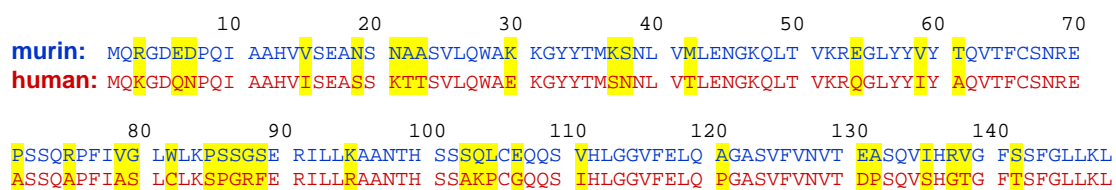
## 5.6 RNS-Aptamere

RNS unterscheidet sich von DNS durch die Hydroxygruppe anstelle des Wasserstoff-Atoms an der 2'-Position des Pentose-Rings. Dieser Unterschied bewirkt, dass RNS deutlich instabiler als DNS ist, da es zu einer Hydrolyse durch Basen kommen kann. Vor allem unter Serumbedingungen sind RNS-Moleküle wesentlich weniger stabil als DNS. Durch den Einbau modifizierter Pyrimidinbasen (2'-Amino-, 2'-Fluoro- oder 2'-Bromo-Reste, siehe Abbildung 4.30) soll RNS allerdings nahezu resistent gegen Nukleasen werden (Kubik et al., 1997; Pieken et al., 1991). Wie DNS-Aptamere falten sich auch RNS-Aptamere durch die Ausbildung intramolekularer Basenpaarungen zu dreidimensionalen Strukturen. Dabei sind die möglichen dreidimensionalen Strukturen von RNS diverser. Im Bezug auf Bindungsspezifität und Affinität sind RNS- und DNS-Aptamere vergleichbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben CD40L-spezifischen DNS-Aptameren auch 2'-Fluoro- Pyrimidin stabilisierte RNS-Aptamere mit einer Länge von 92 Basen untersucht, die innerhalb der Gruppe selektiert wurden. Die Charakterisierung der 13

verschiedenen RNS-Aptamere auf molekularer Ebene anhand von Filterbindungsanalysen erfolgte in Analogie zu den Untersuchungen der DNS-Aptamere. Neben Spezifität, Stabilität, Bindungsbereich und Affinität war dabei vor allem von Bedeutung, ob eine Kreuzreaktivität mit dem löslichen CD40L der Maus besteht, da diese Eigenschaft bei den DNS-Aptameren nicht beobachtet wurde.

Die Versuche zeigten, dass auch die RNS-Aptamere mit sehr hoher Spezifität an das humane rekombinante lösliche CD40L (PeproTech) binden (Zielmolekül der in vitro Selektion). Alternative kommerziell erhältliche CD40L-Produkte, wie lösliches CD40L weiterer Anbieter (ENZO Life Sciences oder Sigma-Aldrich) oder das CD40L-Hexamer *MegaCD40L*<sup>TM</sup> (ebenfalls ENZO Life Sciences), wurden durchweg nur schlecht oder gar nicht erkannt (vgl. Abbildung 4.32). Diese Eigenschaft erschwert den Einsatz der RNS-Aptamere in zellulären Untersuchungssystemen, da das lösliche CD40L allein zur Stimulation von B-Zellen nicht ausreicht. Sehr interessant war dagegen, dass die RNS-Aptamere das murine, rekombinant hergestellte lösliche CD40L (PeproTech) in vergleichbarer Weise banden, wie die humane Variante (vgl. Abbildung 4.38). Es ist somit wahrscheinlich, dass die RNS-Aptamere in einem Bereich binden, der in humanem und murinem sCD40L konserviert ist. In Abbildung 5.3 ist ein Alignment der Aminosäuresequenzen von murinem (blau) und humanem (rot) löslichen CD40L dargestellt, wobei nicht-konservierte Bereiche gelb hervorgehoben sind. Durch die Kreuzreaktivität der RNS-Aptamere mit dem sCD40L der Maus wäre die präklinische Validierung im Mausmodell möglich, vorausgesetzt das zelluläre Zielprotein wird ebenfalls von den Aptameren gebunden. Im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit war es allerdings nicht möglich, dieser Fragestellung nachzugehen.



**Abb. 5.3: Alignment der Aminosäuresequenzen von murinem (blau) und humanem (rot) löslichen CD40L.** Die 149 Aminosäuren langen Sequenzen der löslichen Form von murinem (blau) und humanem (rot) CD40L (PeproTech) sind dargestellt. Gelb hervorgehoben sind die Bereiche, die sich in humanem und murinem sCD40L unterscheiden (nicht-konservierte Bereiche) (Quelle: NCBI Reference Sequence: murin NP\_035746.2, human NP\_000065.1).

Die Untersuchungen zur Stabilität der 2'-Fluoro modifizierten RNS-Aptamere in RPMI-Medium und auch in Gegenwart von 1 % Humanserum über einen Zeitraum von 24 h lieferten erstaunliche Ergebnisse (vgl. Abbildungen 4.33 und 4.34). Während vor allem das DNS-Aptamer S51A-C10, auch in RPMI mit 1 % Humanserum über 24 h, eine

überraschend stabile Bindung an die Zielstruktur zeigte, brach die Bindung aller RNS-Aptamere in RPMI mit 1 % Humanserum schon nach 30 min nahezu komplett ein. Diese Ergebnisse entsprachen nicht den Erwartungen, da der Einbau von 2'-Fluoropyrimidinen die Stabilität deutlich verbessern sollte (Pieken et al., 1991). Allerdings schützt der Einbau 2'-modifizierter Nukleotide vor allem vor Endonukleasen und weniger vor Exonukleasen (Eaton & Pieken, 1995). In Serum wurde hauptsächlich eine 3'-Exonuklease-Aktivität beobachtet, wohingegen die Aktivität von Endonukleasen in Serum vernachlässigbar zu sein scheint (Eder et al., 1991; Holt et al., 1988). Dazu kommt, dass die Stabilität einzelsträngiger Nukleinsäuren im Allgemeinen auch von deren dreidimensionaler Struktur abhängt. So wirken sich G-Quartette stabilisierend aus und auch Sequenzen mit innenliegenden Enden zeigen gegenüber Sequenzen mit freiliegenden Enden einen Stabilitätsvorteil (Choi et al., 2010; Di Giusto et al., 2006).

Auch für die RNS-Aptamere wurden Wettbewerbsversuche mit CD40, dem natürlichen Interaktionspartner von CD40L, durchgeführt, um den Bindungsbereich der RNS-Aptamere an CD40L einzugrenzen. Nur Aptamere, die in einem ähnlichen Bereich wie CD40 binden, können möglicherweise auch inhibierend wirken. Wie auch bei den DNS-Aptameren führte die Zugabe steigender Konzentrationen an CD40 in den Bindungsansatz zur Konkurrenz der RNS-Aptamerbindung an sCD40L (vgl. Abbildung 4.36). Dabei ließen sich die RNS-Aptamere deutlich stärker durch CD40 verdrängen als die DNS-Aptamere, was ein Hinweis auf eine schwächere Affinität der RNS-Aptamere sein kann. Dieser Verdacht wurde durch die Bestimmung der  $K_d$  von drei interessanten RNS-Aptameren durch Filterbindungsanalysen bestätigt. Während das DNS-Aptamer S51A-C10 mit einer  $K_d$  von 2,3 nM sehr affin ist, ergaben sich für die RNS-Aptamere S132E-C11, -C26 und -C28 um zwei Log-Stufen höhere  $K_d$ -Werte im nanomolaren Bereich (233 nM, 245 nM bzw. 267 nM, vgl. Abbildung 4.37).

Bis jetzt wurde noch keine Immunogenität von RNS- oder DNS-Aptameren beobachtet (White et al., 2000). Die deutlich unstabileren RNS-Aptamere benötigen allerdings deutlich komplexere Modifikationen zur Stabilisierung. Vor diesem Hintergrund sowie den sehr positiven Stabilitätsdaten und den besseren Affinitäten der unmodifizierten DNS-Aptamere fallen die CD40L-RNS-Aptamere zurück. Der einzig wirklich nennenswerte Vorteil der hier untersuchten CD40L-spezifischen RNS-Aptamere ist die Kreuzreaktivität zum sCD40L der Maus, wodurch eine präklinische Validierung im Tiermodell deutlich erleichtert wäre.

## 5.7 Ausblick

In dieser Arbeit konnte das vielversprechende therapeutische Potential von Aptameren im Allgemeinen und von CD40L-spezifischen Aptameren im Speziellen gezeigt werden. Je nach Struktur binden auch primär unstabilisierte natürliche DNS-Aptamere mit überraschender Stabilität und hoher Spezifität an ihre Zielstruktur. Dabei zeigten die Aptamere auch eine inhibitorische Funktion, indem sie die aktivierungsinduzierte Aufregulation der CD86-Expression auf humanen B-Zellen verringern konnten. Durchgängig wurde beobachtet, dass das hier validierte DNS-Aptamer S51A-C10 sowie die verkürzte Variante C10-28 in ihrem Bindungsverhalten nicht mit dem eines herkömmlichen anti-CD40L-Antikörpers vergleichbar sind. Auch stimulationsabhängig ergaben sich deutliche Unterschiede im Bindungsverhalten der Aptamere an das zelluläre CD40L. Bislang konnte nicht abschließend geklärt werden, ob die Trimerisierung von CD40L schon intrazellulär oder erst auf der Oberfläche der T-Zellen zustande kommt (Graf et al., 1995). Auch die Abspaltung des CD40L auf der zellulären Oberfläche zu löslichen Formen von CD40L steht einer direkten Freisetzung von löslichem CD40L gegenüber (Ludewig et al., 1996). Die vielseitigen Formen von CD40L und die Entdeckung, dass CD40L nicht, wie anfangs angenommen, nur auf der Oberfläche aktivierter CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, sondern auch einer Vielzahl anderer Zelltypen exprimiert wird, machen CD40L zwar als Zielprotein nicht weniger interessant, aber deutlich komplexer (Schönbeck & Libby, 2001). Im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit konnte nicht geklärt werden, ob sich die Zellen, die von dem CD40L-DNS-Aptamer gebunden werden, in ihrer Funktion von den restlichen CD40L-positiven Zellen unterscheiden. Diese Fragestellung muss adressiert werden, bevor eine therapeutische Anwendung der DNS-Aptamere denkbar ist. Sollte die Charakterisierung ungünstige Eigenschaften der Aptamere ergeben, die ursprünglich gegen lösliches, rekombinantes CD40L-Monomer selektiert wurden, wäre eine Selektion neuer Aptamere anhand einer Zell-Selektion mit CD40L-positiven Zellen eine Möglichkeit, diese Nachteile zu umgehen (Fang & Tan, 2009; Shamah et al., 2008). In dem zwar etwas aufwendigeren Verfahren könnten Aptamere mit verbesserten Spezifitäten und Affinitäten für das zelluläre CD40L-Trimer identifiziert werden.

In Multimerisierungsstudien konnte die Affinität der Aptamere über den Aviditätseffekt gesteigert werden. Im Rahmen der Multimerisierung ist es von besonderer Wichtigkeit, dem Aptamer ausreichend Freiheitsgrade zur optimalen Faltung zu ermöglichen, indem Abstandhalter von geeigneter Länge verwendet werden. Dieser Aspekt ist auch im



Zuge der Entwicklung bispezifischer multivalenter Aptamere zur Redirektion von Immuneffektorzellen durch Verbrückung von Tumor- und Immuneffektorzellen von großer Bedeutung. In dieser Arbeit wurden sehr erfolgreiche Machbarkeitsuntersuchungen zur Übertragung des klinisch vielversprechenden Konzepts auf die Stoffklasse der Aptamere durchgeführt. In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde die Verbrückung von Tumor- und Effektorzelllinien gezeigt und auch die dadurch vermittelte Zelllyse konnte anhand durchflusszytometrischer Analysen beobachtet werden. Dieser Ansatz muss in Zukunft genauer untersucht werden und eventuell mit dem hier charakterisierten CD40L-spezifischen DNS-Aptamer C10-28 als Effektorzellbinder weiter verfolgt werden. Dafür sollte, wie schon erwähnt, geklärt werden, ob sich die Zellen, die von dem CD40L-DNS-Aptamer gebunden werden, in ihrer Funktion von den restlichen CD40L-positiven Zellen unterscheiden. Zudem muss im nächsten Schritt eine Selektion zur Identifizierung von Aptameren durchgeführt werden, die gegen ein Zielprotein auf Tumorzellen gerichtet sind. Dafür erscheint CD20, das auf der Oberfläche von gesunden und malignen B-Zellen zu finden ist, ein geeignetes Zielprotein zu sein (Reff et al., 1994). In bereits zugelassenen Therapieansätzen mit dem monoklonalen Antikörper Rituximab dient CD20 als Zielstruktur und auch der trifunktionale bispezifische Antikörper FBTA05 (Bi20), der derzeit in klinischen Studien geprüft wird, ist gegen CD20 (und CD3) gerichtet (Buhmann et al., 2009; McLaughlin, 2001; Stanglmaier et al., 2008). Durch die Generierung eines bispezifischen multivalenten anti-CD40L x anti-CD20 Aptamers kann somit auf den bereits erlangten experimentellen und klinischen Erfahrungen mit Rituximab sowie FBTA05 aufgebaut werden. Vor dem Hintergrund der Entwicklung bispezifischer multivalenter Aptamere ist auch die Validierung von Multimerisierungsstrategien wichtig. Für die modulare Verbrückung unterschiedlicher Aptamere über einen PEG-Linker ist es notwendig, die entsprechenden Reaktionsbedingungen zu untersuchen, sodass eine gerichtete und stufenweise Kopplung von unterschiedlichen Aptameren an die Brückenmoleküle möglich ist.

Im Hinblick auf den therapeutischen Einsatz von Aptameren ist es wichtig, wie auch bei anderen Therapeutika auf Basis von Nukleinsäuren, über mögliche Probleme oder Interferenzen mit anderen Medikamenten nachzudenken. Mittlerweile gibt es eine Reihe von Therapieansätzen aus der Stoffklasse der Nukleinsäuren, die in klinischen Studien untersucht werden oder schon fester Therapiebestandteil sind. Neben Aptameren zählen dazu Nukleosid-Analoga, wie Zytostatika (z. B. Fludarabin, Cytarabin) oder Virostatika (z. B. Aciclovir oder Ganciclovir), Ribozyme (z. B. *Herzyme*<sup>®</sup> und *Angiozyme*<sup>®</sup>), Antisense-Oligonukleotide (z. B. Formivirsen), RNS-Interferenz (z.

B. Bevasiranib) sowie natürliche DNS-Derivate (z. B. Defibrotide). Seit Mai 2006 ist auch das erste Aptamer-basierte Medikament in Deutschland zugelassen (Mayer & Famulok, 2007). Die geringe Größe von Aptameren führt zwar einerseits zu sehr guter Penetration von Geweben (z. B. Tumoren), andererseits zu ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften. In den meisten Fällen wird dieser Nachteil über PEGylierung erfolgreich umgangen. Durch die Entwicklung bispezifischer multivalenter Aptamere, die über verzweigte PEG-Moleküle verknüpft sind, kann somit nicht nur die therapeutische Effizienz beeinflusst, sondern zeitgleich die pharmakokinetischen Eigenschaften verbessert werden.

Die überaus vorteilhaften Eigenschaften von Aptameren gegenüber Antikörpern und auch die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten zeigen das hohe therapeutische Potential von Aptameren. Die Übertragung des innovativen Therapieansatzes der Redirektion von Immuneffektorzellen auf die Stoffklasse der Aptamere erscheint deshalb hochinteressant und vielversprechend.

## 6 Literaturverzeichnis

- Allen, R.C., Armitage, R.J., Conley, M.E., Rosenblatt, H., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bedell, M.A., Edelhoff, S., Distech, C.M., Simoneaux, D.K. and et al. (1993) CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science*, **259**, 990-993.
- Baaske, P., Duhr, S. and Braun, D. (2007) Melting curve analysis in a snapshot. *Appl Phys Lett*, **91**, 133901.
- Baaske, P., Wienken, C.J., Reineck, P., Duhr, S. and Braun, D. (2010) Optical thermophoresis for quantifying the buffer dependence of aptamer binding. *Angew Chem Int Ed Engl*, **49**, 2238-2241.
- Bargou, R., Leo, E., Zugmaier, G., Klinger, M., Goebeler, M., Knop, S., Noppeney, R., Viardot, A., Hess, G., Schuler, M., Einsele, H., Brandl, C., Wolf, A., Kirchlinger, P., Klappers, P., Schmidt, M., Riethmüller, G., Reinhardt, C., Baeuerle, P.A. and Kufer, P. (2008) Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science*, **321**, 974-977.
- Baron, F., Deprez, M. and Beguin, Y. (1997) The veno-occlusive disease of the liver. *Haematologica*, **82**, 718-725.
- Beutel, B.A. and Gold, L. (1992) In vitro evolution of intrinsically bent DNA. *J Mol Biol*, **228**, 803-812.
- Blazar, B.R., Taylor, P.A., Noelle, R.J. and Vallera, D.A. (1998) CD4(+) T cells tolerized ex vivo to host alloantigen by anti-CD40 ligand (CD40L:CD154) antibody lose their graft-versus-host disease lethality capacity but retain nominal antigen responses. *J Clin Invest*, **102**, 473-482.
- Blazar, B.R., Taylor, P.A., Panoskaltsis-Mortari, A., Buhlman, J., Xu, J., Flavell, R.A., Korngold, R., Noelle, R. and Vallera, D.A. (1997) Blockade of CD40 ligand-CD40 interaction impairs CD4+ T cell-mediated alloreactivity by inhibiting mature donor T cell expansion and function after bone marrow transplantation. *J Immunol*, **158**, 29-39.
- Boado, R.J. and Pardridge, W.M. (1992) Complete protection of antisense oligonucleotides against serum nuclease degradation by an avidin-biotin system. *Bioconjug Chem*, **3**, 519-523.
- Bock, L.C., Griffin, L.C., Latham, J.A., Vermaas, E.H. and Toole, J.J. (1992) Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, **355**, 564-566.
- Boltz, A., Piater, B., Toleikis, L., Guenther, R., Kolmar, H. and Hock, B. (2011) Bi-specific aptamers mediating tumor cell lysis. *J Biol Chem*, **286**, 21896-21905.
- Bouchard, P.R., Hutabarat, R.M. and Thompson, K.M. (2010) Discovery and development of therapeutic aptamers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **50**, 237-257.
- Boumpas, D.T., Furie, R., Manzi, S., Illei, G.G., Wallace, D.J., Balow, J.E., Vaishnaw, A. and on behalf of the, B.G.L.N.T.G. (2003) A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis. *Arthritis & Rheumatism*, **48**, 719-727.
- Brams, P., Black, A., Padlan, E.A., Hariharan, K., Leonard, J., Chambers-Slater, K., Noelle, R.J. and Newman, R. (2001) A humanized anti-human CD154

- monoclonal antibody blocks CD154-CD40 mediated human B cell activation. *Int Immunopharmacol*, **1**, 277-294.
- Buhlmann, J.E., Gonzalez, M., Ginther, B., Panoskaltsis-Mortari, A., Blazar, B.R., Greiner, D.L., Rossini, A.A., Flavell, R. and Noelle, R.J. (1999) Cutting edge: sustained expansion of CD8<sup>+</sup> T cells requires CD154 expression by Th cells in acute graft versus host disease. *J Immunol*, **162**, 4373-4376.
- Buhmann, R., Simoes, B., Stanglmaier, M., Yang, T., Faltin, M., Bund, D., Lindhofer, H. and Kolb, H.J. (2009) Immunotherapy of recurrent B-cell malignancies after allo-SCT with Bi20 (FBTA05), a trifunctional anti-CD3 x anti-CD20 antibody and donor lymphocyte infusion. *Bone Marrow Transplant*, **43**, 383-397.
- Burmeister, P.E., Wang, C., Killough, J.R., Lewis, S.D., Horwitz, L.R., Ferguson, A., Thompson, K.M., Pendergrast, P.S., McCauley, T.G., Kurz, M., Diener, J., Cload, S.T., Wilson, C. and Keefe, A.D. (2006) 2'-Deoxy purine, 2'-O-methyl pyrimidine (dRmY) aptamers as candidate therapeutics. *Oligonucleotides*, **16**, 337-351.
- Butcher, B.W. and Collins, R.H., Jr. (2005) The graft-versus-lymphoma effect: clinical review and future opportunities. *Bone Marrow Transplant*, **36**, 1-17.
- Cazenave, C. and Uhlenbeck, O.C. (1994) RNA template-directed RNA synthesis by T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 6972-6976.
- Chames, P. and Baty, D. (2009a) Bispecific antibodies for cancer therapy. *Curr Opin Drug Discov Devel*, **12**, 276-283.
- Chames, P. and Baty, D. (2009b) Bispecific antibodies for cancer therapy: the light at the end of the tunnel? *MAbs*, **1**, 539-547.
- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E. and Baty, D. (2009) Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol*, **157**, 220-233.
- Cheson, B.D. (2006) Monoclonal antibody therapy for B-cell malignancies. *Semin Oncol*, **33**, S2-14.
- Choi, E.W., Nayak, L.V. and Bates, P.J. (2010) Cancer-selective antiproliferative activity is a general property of some G-rich oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res*, **38**, 1623-1635.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- Chu, T.C., Twu, K.Y., Ellington, A.D. and Levy, M. (2006) Aptamer mediated siRNA delivery. *Nucleic Acids Res*, **34**, e73.
- Clark, E.A. and Ledbetter, J.A. (1986) Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 4494-4498.
- Damas, J.K., Otterdal, K., Yndestad, A., Aass, H., Solum, N.O., Froland, S.S., Simonsen, S., Aukrust, P. and Andreassen, A.K. (2004) Soluble CD40 ligand in pulmonary arterial hypertension: possible pathogenic role of the interaction between platelets and endothelial cells. *Circulation*, **110**, 999-1005.
- De Reys, S., Blom, C., Lepoudre, B., Declerck, P.J., De Ley, M., Vermyn, J. and Deckmyn, H. (1993) Human platelet aggregation by murine monoclonal antiplatelet antibodies is subtype-dependent. *Blood*, **81**, 1792-1800.

- Dhont, J.K. (2004) Thermodiffusion of interacting colloids. I. A statistical thermodynamics approach. *J Chem Phys*, **120**, 1632-1641.
- Di Giusto, D.A., Knox, S.M., Lai, Y., Tyrelle, G.D., Aung, M.T. and King, G.C. (2006) Multitasking by multivalent circular DNA aptamers. *Chembiochem*, **7**, 535-544.
- Drolet, D.W., Moon-McDermott, L. and Romig, T.S. (1996) An enzyme-linked oligonucleotide assay. *Nat Biotechnol*, **14**, 1021-1025.
- Duhr, S., Arduini, S. and Braun, D. (2004) Thermophoresis of DNA determined by microfluidic fluorescence. *Eur Phys J E Soft Matter*, **15**, 277-286.
- Duhr, S. and Braun, D. (2006) Why molecules move along a temperature gradient. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 19678-19682.
- Durie, F.H., Aruffo, A., Ledbetter, J., Crassi, K.M., Green, W.R., Fast, L.D. and Noelle, R.J. (1994a) Antibody to the ligand of CD40, gp39, blocks the occurrence of the acute and chronic forms of graft-vs-host disease. *J Clin Invest*, **94**, 1333-1338.
- Durie, F.H., Foy, T.M., Masters, S.R., Laman, J.D. and Noelle, R.J. (1994b) The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. *Immunol Today*, **15**, 406-411.
- Eaton, B.E. and Pieken, W.A. (1995) Ribonucleosides and RNA. *Annu Rev Biochem*, **64**, 837-863.
- Eder, P.S., DeVine, R.J., Dagle, J.M. and Walder, J.A. (1991) Substrate specificity and kinetics of degradation of antisense oligonucleotides by a 3' exonuclease in plasma. *Antisense Res Dev*, **1**, 141-151.
- Ellington, A.D. and Szostak, J.W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, **346**, 818-822.
- Ellington, A.D. and Szostak, J.W. (1992) Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature*, **355**, 850-852.
- Famulok, M. (1994) Molecular recognition of amino acids by RNA-aptamers: An L-citrulline binding RNA motif and its evolution into an L-arginine binder. *J Am Chem Soc*, **116**, 1698-1706.
- Fang, X. and Tan, W. (2009) Aptamers generated from cell-SELEX for molecular medicine: a chemical biology approach. *Acc Chem Res*, **43**, 48-57.
- Foy, T.M., Aruffo, A., Bajorath, J., Buhlmann, J.E. and Noelle, R.J. (1996) Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu Rev Immunol*, **14**, 591-617.
- Foy, T.M., Shepherd, D.M., Durie, F.H., Aruffo, A., Ledbetter, J.A. and Noelle, R.J. (1993) In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39. *J Exp Med*, **178**, 1567-1575.
- Geiger, A., Burgstaller, P., von der Eltz, H., Roeder, A. and Famulok, M. (1996) RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res*, **24**, 1029-1036.
- Glennie, M.J., McBride, H.M., Worth, A.T. and Stevenson, G.T. (1987) Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments. *J Immunol*, **139**, 2367-2375.
- Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O. and Yarus, M. (1995) Diversity of oligonucleotide functions. *Annu Rev Biochem*, **64**, 763-797.

- Goldenberg, D.M., Rossi, E.A., Sharkey, R.M., McBride, W.J. and Chang, C.H. (2008) Multifunctional antibodies by the Dock-and-Lock method for improved cancer imaging and therapy by pretargeting. *J Nucl Med*, **49**, 158-163.
- Graf, D., Korthauer, U., Mages, H.W., Senger, G. and Kroczeck, R.A. (1992) Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells. *Eur J Immunol*, **22**, 3191-3194.
- Graf, D., Muller, S., Korthauer, U., van Kooten, C., Weise, C. and Kroczeck, R.A. (1995) A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol*, **25**, 1749-1754.
- Gray, D., Dullforce, P. and Jainandunsing, S. (1994) Memory B cell development but not germinal center formation is impaired by in vivo blockade of CD40-CD40 ligand interaction. *J Exp Med*, **180**, 141-155.
- Green, L.S., Jellinek, D., Bell, C., Beebe, L.A., Feistner, B.D., Gill, S.C., Jucker, F.M. and Janjic, N. (1995) Nuclease-resistant nucleic acid ligands to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Chem Biol*, **2**, 683-695.
- Grimsley, G.R., Scholtz, J.M. and Pace, C.N. (2009) A summary of the measured pK values of the ionizable groups in folded proteins. *Protein Sci*, **18**, 247-251.
- Hasegawa, H., Taira, K.-i., Sode, K. and Ikebukuro, K. (2008) Improvement of aptamer affinity by dimerization. *Sensors*, **8**, 1090-1098.
- Heiss, M.M., Murawa, P., Koralewski, P., Kutarska, E., Kolesnik, O.O., Ivanchenko, V.V., Dudnichenko, A.S., Aleknaviciene, B., Razbadauskas, A., Gore, M., Ganea-Motan, E., Ciuleanu, T., Wimberger, P., Schmittel, A., Schmalfeldt, B., Burges, A., Bokemeyer, C., Lindhofer, H., Lahr, A. and Parsons, S.L. (2010) The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of a prospective randomized phase II/III trial. *Int J Cancer*, **127**, 2209-2221.
- Heiss, M.M., Strohlein, M.A., Jager, M., Kimmig, R., Burges, A., Schoberth, A., Jauch, K.W., Schildberg, F.W. and Lindhofer, H. (2005) Immunotherapy of malignant ascites with trifunctional antibodies. *Int J Cancer*, **117**, 435-443.
- Henn, V., Steinbach, S., Büchner, K., Presek, P. and Kroczeck, R.A. (2001) The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood*, **98**, 1047-1054.
- Hollenbaugh, D., Grosmaire, L.S., Kullas, C.D., Chalupny, N.J., Braesch-Andersen, S., Noelle, R.J., Stamenkovic, I., Ledbetter, J.A. and Aruffo, A. (1992) The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. *Embo J*, **11**, 4313-4321.
- Holliger, P., Prospero, T. and Winter, G. (1993) "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6444-6448.
- Holt, J.T., Redner, R.L. and Nienhuis, A.W. (1988) An oligomer complementary to c-myc mRNA inhibits proliferation of HL-60 promyelocytic cells and induces differentiation. *Mol Cell Biol*, **8**, 963-973.
- Howard, L.M., Miga, A.J., Vanderlugt, C.L., Canto, M.C.D., Laman, J.D., Noelle, R.J. and Miller, S.D. (1999) Mechanisms of immunotherapeutic intervention by anti-CD40L (CD154) antibody in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest*, **103**, 281-290.
- Hsu, Y.M., Lucci, J., Su, L., Ehrenfels, B., Garber, E. and Thomas, D. (1997) Heteromultimeric complexes of CD40 ligand are present on the cell surface of human T lymphocytes. *J Biol Chem*, **272**, 911-915.

- Iacopini, S. and Piazza, R. (2003) Thermophoresis in protein solutions. *Europhys. Lett.*, **63**, 247-253.
- Ito, H., Kurtz, J., Shaffer, J. and Sykes, M. (2001) CD4 T cell-mediated alloresistance to fully MHC-mismatched allogeneic bone marrow engraftment is dependent on CD40-CD40 ligand interactions, and lasting T cell tolerance is induced by bone marrow transplantation with initial blockade of this pathway. *J Immunol*, **166**, 2970-2981.
- Jellinek, D., Green, L.S., Bell, C., Lynott, C.K., Gill, N., Vargeese, C., Kirschenheuter, G., McGee, D.P., Abesinghe, P., Pieken, W.A. and et al. (1995) Potent 2'-amino-2'-deoxypyrimidine RNA inhibitors of basic fibroblast growth factor. *Biochemistry*, **34**, 11363-11372.
- Jellinek, D., Lynott, C.K., Rifkin, D.B. and Janjic, N. (1993) High-affinity RNA ligands to basic fibroblast growth factor inhibit receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 11227-11231.
- Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A. and Polisky, B. (1994) High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science*, **263**, 1425-1429.
- June, C.H., Bluestone, J.A., Nadler, L.M. and Thompson, C.B. (1994) The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today*, **15**, 321-331.
- Kalunian, K.C., Davis, J.C., Merrill, J.T., Totoritis, M.C., Wofsy, D. and for the, I.-L.S.G. (2002) Treatment of systemic lupus erythematosus by inhibition of T cell costimulation with anti-CD154: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis & Rheumatism*, **46**, 3251-3258.
- Karpusas, M., Hsu, Y.M., Wang, J.H., Thompson, J., Lederman, S., Chess, L. and Thomas, D. (1995) 2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure*, **3**, 1426.
- Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T. and Kikutani, H. (1994) The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity*, **1**, 167-178.
- Kawai, T., Andrews, D., Colvin, R.B., Sachs, D.H. and Cosimi, A.B. (2000) Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. *Nat Med*, **6**, 114.
- Kawazoe, N., Ito, Y. and Imanishi, Y. (1996) Patterned staining by fluorescein-labeled oligonucleotides obtained by in vitro selection. *Anal Chem*, **68**, 4309-4311.
- Keefe, A.D., Pai, S. and Ellington, A. (2010) Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, **9**, 537-550.
- Kipriyanov, S.M., Moldenhauer, G., Schuhmacher, J., Cochlovius, B., Von der Lieth, C.W., Matys, E.R. and Little, M. (1999) Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics. *J Mol Biol*, **293**, 41-56.
- Kirk, A.D., Burkly, L.C., Batty, D.S., Baumgartner, R.E., Berning, J.D., Buchanan, K., Fechner, J.H., Jr., Germond, R.L., Kampen, R.L., Patterson, N.B., Swanson, S.J., Tadaki, D.K., TenHoor, C.N., White, L., Knechtle, S.J. and Harlan, D.M. (1999) Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat Med*, **5**, 686-693.

- Klumb, L.A., Chu, V. and Stayton, P.S. (1998) Energetic roles of hydrogen bonds at the ureido oxygen binding pocket in the streptavidin-biotin complex. *Biochemistry*, **37**, 7657-7663.
- Köhler, G. and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495-497.
- Kornblum, N., Ayyanar, K., Benimetskaya, L., Richardson, P., Iacobelli, M. and Stein, C.A. (2006) Defibrotide, a polydisperse mixture of single-stranded phosphodiester oligonucleotides with lifesaving activity in severe hepatic veno-occlusive disease: clinical outcomes and potential mechanisms of action. *Oligonucleotides*, **16**, 105-114.
- Kover, K.L., Geng, Z., Hess, D.M., Benjamin, C.D. and Moore, W.V. (2000) Anti-CD154 (CD40L) prevents recurrence of diabetes in islet isografts in the DR-BB rat. *Diabetes*, **49**, 1666-1670.
- Kubik, M.F., Bell, C., Fitzwater, T., Watson, S.R. and Tasset, D.M. (1997) Isolation and characterization of 2'-fluoro-, 2'-amino-, and 2'-fluoro-/amino-modified RNA ligands to human IFN-gamma that inhibit receptor binding. *J Immunol*, **159**, 259-267.
- Kuwana, M., Nomura, S., Fujimura, K., Nagasawa, T., Muto, Y., Kurata, Y., Tanaka, S. and Ikeda, Y. (2004) Effect of a single injection of humanized anti-CD154 monoclonal antibody on the platelet-specific autoimmune response in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Blood*, **103**, 1229-1236.
- Lato, S.M., Boles, A.R. and Ellington, A.D. (1995) In vitro selection of RNA lectins: using combinatorial chemistry to interpret ribozyme evolution. *Chem Biol*, **2**, 291-303.
- Lee, J.F., Stovall, G.M. and Ellington, A.D. (2006) Aptamer therapeutics advance. *Curr Opin Chem Biol*, **10**, 282-289.
- Lin, Y., Nieuwlandt, D., Magallanez, A., Feistner, B. and Jayasena, S.D. (1996) High-affinity and specific recognition of human thyroid stimulating hormone (hTSH) by in vitro-selected 2'-amino-modified RNA. *Nucleic Acids Res*, **24**, 3407-3414.
- Lindhofer, H., Mocikat, R., Steipe, B. and Thierfelder, S. (1995) Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies. *J Immunol*, **155**, 219-225.
- Liu, Y. and Linsley, P.S. (1992) Costimulation of T-cell growth. *Curr Opin Immunol*, **4**, 265-270.
- Ludewig, B., Henn, V., Schroder, J.M., Graf, D. and Kroczeck, R.A. (1996) Induction, regulation, and function of soluble TRAP (CD40 ligand) during interaction of primary CD4+ CD45RA+ T cells with dendritic cells. *Eur J Immunol*, **26**, 3137-3143.
- Ludwig, C. (1856) Diffusion zwischen ungleich erwärmten Orten gleich zusammengesetzter Lösungen. *Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Classe*, **20**, 539.
- Luzi, E., Minunni, M., Tombelli, S. and Mascini, M. (2003) New trends in affinity sensing: aptamers for ligand binding. *Trends Anal Chem*, **22**, 810-818.
- Ma, Y.J., Dissen, G.A., Rage, F. and Ojeda, S.R. (1996) RNase Protection Assay. *Methods*, **10**, 273-278.
- Majerfeld, I. and Yarus, M. (1994) An RNA pocket for an aliphatic hydrophobe. *Nat Struct Biol*, **1**, 287-292.



- Mallikaratchy, P., Tang, Z., Kwame, S., Meng, L., Shangguan, D. and Tan, W. (2007) Aptamer directly evolved from live cells recognizes membrane bound immunoglobulin heavy mu chain in Burkitt's lymphoma cells. *Mol Cell Proteomics*, **6**, 2230-2238.
- Matzinger, P. (2002) The danger model: a renewed sense of self. *Science*, **296**, 301-305.
- Mayer, G. and Famulok, M. (2007) Nucleic acids in the drug discovery process: aptamers as therapeutic and as active ingredients for drugs. *Pharm Unserer Zeit*, **36**, 432-436.
- McLaughlin, P. (2001) Rituximab: perspective on single agent experience, and future directions in combination trials. *Crit Rev Oncol Hematol*, **40**, 3-16.
- Mirabet, M., Barrabes, J.A., Quiroga, A. and Garcia-Dorado, D. (2008) Platelet pro-aggregatory effects of CD40L monoclonal antibody. *Mol Immunol*, **45**, 937-944.
- Mohrbacher, A. (2005) B cell non-Hodgkin's lymphoma: rituximab safety experience. *Arthritis Res Ther*, **7 Suppl 3**, S19-25.
- Morecki, S., Lindhofer, H., Yacovlev, E., Gelfand, Y., Ruf, P. and Slavin, S. (2008) Induction of long-lasting antitumor immunity by concomitant cell therapy with allogeneic lymphocytes and trifunctional bispecific antibody. *Exp Hematol*, **36**, 997-1003.
- Morecki, S., Lindhofer, H., Yacovlev, E., Gelfand, Y. and Slavin, S. (2006) Use of trifunctional bispecific antibodies to prevent graft versus host disease induced by allogeneic lymphocytes. *Blood*, **107**, 1564-1569.
- Müller, D. and Kontermann, R.E. (2007) Recombinant bispecific antibodies for cellular cancer immunotherapy. *Curr Opin Mol Ther*, **9**, 319-326.
- Müller, D. and Kontermann, R.E. (2010) Bispecific antibodies for cancer immunotherapy: Current perspectives. *BioDrugs*, **24**, 89-98.
- Ni, X., Castanares, M., Mukherjee, A. and Lupold, S.E. (2011) Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons. *Curr Med Chem*, **18**, 4206-4214.
- Nieuwlandt, D., Wecker, M. and Gold, L. (1995) In vitro selection of RNA ligands to substance P. *Biochemistry*, **34**, 5651-5659.
- Nimjee, S.M., Rusconi, C.P. and Sullenger, B.A. (2005) Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annu Rev Med*, **56**, 555-583.
- Noel, P.J., Boise, L.H., Green, J.M. and Thompson, C.B. (1996) CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation. *J Immunol*, **157**, 636-642.
- Noelle, R.J. (1996) CD40 and its ligand in host defense. *Immunity*, **4**, 415-419.
- Nüsslein, H.G., Frosch, K.H., Woith, W., Lane, P., Kalden, J.R. and Manger, B. (1996) Increase of intracellular calcium is the essential signal for the expression of CD40 ligand. *Eur J Immunol*, **26**, 846-850.
- O'Sullivan, C.K. (2002) Aptasensors--the future of biosensing? *Anal Bioanal Chem*, **372**, 44-48.
- Osborne, S.E., Völker, J., Stevens, S.Y., Breslauer, K.J. and Glick, G.D. (1996) Design, synthesis, and analysis of disulfide cross-linked DNA duplexes. *J Am Chem Soc*, **118**, 11993-12003.

- Pace, C.N., Grimsley, G.R. and Scholtz, J.M. (2009) Protein ionizable groups: pK values and their contribution to protein stability and solubility. *J Biol Chem*, **284**, 13285-13289.
- Peipp, M. and Valerius, T. (2002) Bispecific antibodies targeting cancer cells. *Biochem Soc Trans*, **30**, 507-511.
- Peitsch, M.C. and Jongeneel, C.V. (1993) A 3-D model for the CD40 ligand predicts that it is a compact trimer similar to the tumor necrosis factors. *Int Immunol*, **5**, 233-238.
- Pieken, W.A., Olsen, D.B., Benseler, F., Aurup, H. and Eckstein, F. (1991) Kinetic characterization of ribonuclease-resistant 2'-modified hammerhead ribozymes. *Science*, **253**, 314-317.
- Pietravalle, F., Lecoanet-Henchoz, S., Blasey, H., Aubry, J.-P., Elson, G., Edgerton, M.D., Bonnefoy, J.-Y. and Gauchat, J.-F.o. (1996) Human Native Soluble CD40L Is a Biologically Active Trimer, Processed Inside Microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 5965-5967.
- Porter, D.L., Levine, B.L., Bunin, N., Stadtmauer, E.A., Luger, S.M., Goldstein, S., Loren, A., Phillips, J., Nasta, S., Perl, A., Schuster, S., Tsai, D., Sohal, A., Veloso, E., Emerson, S. and June, C.H. (2006) A phase 1 trial of donor lymphocyte infusions expanded and activated ex vivo via CD3/CD28 costimulation. *Blood*, **107**, 1325-1331.
- Proske, D., Blank, M., Buhmann, R. and Resch, A. (2005) Aptamers--basic research, drug development, and clinical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, **69**, 367-374.
- Rauch, J. and Köhler, W. (2003) Collective and thermal diffusion in dilute, semidilute, and concentrated solutions of polystyrene in toluene. *Appl Phys Lett*, **119**, 11977-11988.
- Reff, M.E., Carner, K., Chambers, K.S., Chinn, P.C., Leonard, J.E., Raab, R., Newman, R.A., Hanna, N. and Anderson, D.R. (1994) Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*, **83**, 435-445.
- Reineck, P., Wienken, C.J. and Braun, D. (2010) Thermophoresis of single stranded DNA. *Electrophoresis*, **31**, 279-286.
- Ritgen, M., Stilgenbauer, S., von Neuhoff, N., Humpe, A., Bruggemann, M., Pott, C., Raff, T., Krober, A., Bunjes, D., Schlenk, R., Schmitz, N., Dohner, H., Kneba, M. and Dreger, P. (2004) Graft-versus-leukemia activity may overcome therapeutic resistance of chronic lymphocytic leukemia with unmutated immunoglobulin variable heavy-chain gene status: implications of minimal residual disease measurement with quantitative PCR. *Blood*, **104**, 2600-2602.
- Rossi, E.A., Goldenberg, D.M., Cardillo, T.M., McBride, W.J., Sharkey, R.M. and Chang, C.H. (2006) Stably tethered multifunctional structures of defined composition made by the dock and lock method for use in cancer targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 6841-6846.
- Ruf, P. and Lindhofer, H. (2001) Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody. *Blood*, **98**, 2526-2534.
- Santulli-Marotto, S., Nair, S.K., Rusconi, C., Sullenger, B. and Gilboa, E. (2003) Multivalent RNA aptamers that inhibit CTLA-4 and enhance tumor immunity. *Cancer Res*, **63**, 7483-7489.
- Sassanfar, M. and Szostak, J.W. (1993) An RNA motif that binds ATP. *Nature*, **364**, 550-553.

- Schechter, B., Silberman, R., Arnon, R. and Wilchek, M. (1990) Tissue distribution of avidin and streptavidin injected to mice. Effect of avidin carbohydrate, streptavidin truncation and exogenous biotin. *Eur J Biochem*, **189**, 327-331.
- Schönbeck, U. and Libby, P. (2001) The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci*, **58**, 4-43.
- Schönbeck, U., Sukhova, G.K., Shimizu, K., Mach, F. and Libby, P. (2000) Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7458-7463.
- Segal, D.M., Weiner, G.J. and Weiner, L.M. (1999) Bispecific antibodies in cancer therapy. *Curr Opin Immunol*, **11**, 558-562.
- Shamah, S.M., Healy, J.M. and Cload, S.T. (2008) Complex target SELEX. *Acc Chem Res*, **41**, 130-138.
- Shangguan, D., Cao, Z., Meng, L., Mallikaratchy, P., Sefah, K., Wang, H., Li, Y. and Tan, W. (2008) Cell-specific aptamer probes for membrane protein elucidation in cancer cells. *J Proteome Res*, **7**, 2133-2139.
- Shaw, B.R., Moussa, L., Sharaf, M., Cheek, M. and Dobrikov, M. (2008) Boranophosphate siRNA-aptamer chimeras for tumor-specific downregulation of cancer receptors and modulators. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 655-656.
- Shaw, J.P., Fishback, J.A., Cundy, K.C. and Lee, W.A. (1995) A novel oligodeoxynucleotide inhibitor of thrombin. I. In vitro metabolic stability in plasma and serum. *Pharm Res*, **12**, 1937-1942.
- Sidhu, S.S. (2000) Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, **11**, 610-616.
- Soret, C. (1879) *Sur l'état d'équilibre que prend, du point de vue de sa concentration, une dissolution saline primitivement homogène, dont deux parties sont portées à des températures différentes*. Archives de Genève.
- Staerz, U.D., Kanagawa, O. and Bevan, M.J. (1985) Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells. *Nature*, **314**, 628-631.
- Stamenkovic, I., Clark, E.A. and Seed, B. (1989) A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *Embo J*, **8**, 1403-1410.
- Stanglmaier, M., Faltin, M., Ruf, P., Bodenhausen, A., Schroder, P. and Lindhofer, H. (2008) Bi20 (fBTA05), a novel trifunctional bispecific antibody (anti-CD20 x anti-CD3), mediates efficient killing of B-cell lymphoma cells even with very low CD20 expression levels. *Int J Cancer*, **123**, 1181-1189.
- Steen, K.H., Steen, A.E. and Reeh, P.W. (1995) A dominant role of acid pH in inflammatory excitation and sensitization of nociceptors in rat skin, in vitro. *J Neurosci*, **15**, 3982-3989.
- Stoler, D.L., Chen, N., Basik, M., Kahlenberg, M.S., Rodriguez-Bigas, M.A., Petrelli, N.J. and Anderson, G.R. (1999) The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 15121-15126.
- Suarez, A., Mozo, L., Gayo, A., Zamorano, J. and Gutierrez, C. (1997) Requirement of a second signal via protein kinase C or protein kinase A for maximal expression of CD40 ligand. Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Eur J Immunol*, **27**, 2822-2829.

- Tahiri-Alaoui, A., Frigotto, L., Manville, N., Ibrahim, J., Romby, P. and James, W. (2002) High affinity nucleic acid aptamers for streptavidin incorporated into bi-specific capture ligands. *Nucleic Acids Res*, **30**, e45.
- Tangye, S.G., Ferguson, A., Avery, D.T., Ma, C.S. and Hodgkin, P.D. (2002) Isotype switching by human B cells is division-associated and regulated by cytokines. *J Immunol*, **169**, 4298-4306.
- Tidd, D.M. and Warenius, H.M. (1989) Partial protection of oncogene, anti-sense oligodeoxynucleotides against serum nuclease degradation using terminal methylphosphonate groups. *Br J Cancer*, **60**, 343-350.
- Tsai, D.E., Kenan, D.J. and Keene, J.D. (1992) In vitro selection of an RNA epitope immunologically cross-reactive with a peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 8864-8868.
- Tuerk, C. and Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, **249**, 505-510.
- Tuerk, C., MacDougall, S. and Gold, L. (1992) RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 6988-6992.
- Wennemers, H. (2001) Combinatorial chemistry: a tool for the discovery of new catalysts. *Comb Chem High Throughput Screen*, **4**, 273-285.
- White, R.R., Sullenger, B.A. and Rusconi, C.P. (2000) Developing aptamers into therapeutics. *J Clin Invest*, **106**, 929-934.
- Williams, K.P., Liu, X.H., Schumacher, T.N., Lin, H.Y., Ausiello, D.A., Kim, P.S. and Bartel, D.P. (1997) Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11285-11290.
- Xie, Z., Guo, N., Yu, M., Hu, M. and Shen, B. (2005) A new format of bispecific antibody: highly efficient heterodimerization, expression and tumor cell lysis. *J Immunol Methods*, **296**, 95-101.
- Zeidler, R., Mysliwicz, J., Csanady, M., Walz, A., Ziegler, I., Schmitt, B., Wollenberg, B. and Lindhofer, H. (2000) The Fc-region of a new class of intact bispecific antibody mediates activation of accessory cells and NK cells and induces direct phagocytosis of tumour cells. *Br J Cancer*, **83**, 261-266.
- Zeidler, R., Reisbach, G., Wollenberg, B., Lang, S., Chaubal, S., Schmitt, B. and Lindhofer, H. (1999) Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing. *J Immunol*, **163**, 1246-1252.
- Zempleni, J. and Mock, D.M. (2000) Utilization of biotin in proliferating human lymphocytes. *J Nutr*, **130**, 335.
- Zhou, J., Swiderski, P., Li, H., Zhang, J., Neff, C.P., Akkina, R. and Rossi, J.J. (2009) Selection, characterization and application of new RNA HIV gp 120 aptamers for facile delivery of Dicer substrate siRNAs into HIV infected cells. *Nucleic Acids Res*, **37**, 3094-3109.
- Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3406-3415.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Struktur des löslichen CD40-Ligand Monomers (a) und des Homotrimer (b).	7
Abb. 1.2	Übersicht der verschiedenen Antikörper-Formate.	10
Abb. 1.3	Mögliche Sekundärstrukturen von Aptameren.	15
Abb. 1.4	Schematische Darstellung der gezielten Bindung eines Aptamers mit individueller dreidimensionaler Struktur an seine Zielstruktur nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip.	17
Abb. 1.5	Schematische Darstellung einer RNS-SELEX.	18
Abb. 3.1	„Microscale Thermophoresis“.	53
Abb. 3.2	Graphische Darstellung von <i>MegaCD40L</i> <sup>TM</sup> .	66
Abb. 3.3	Beispiel von zwei-dimensionalen Punktdiagrammen („Dot-Plot“) der Lichtstreuung und der Definition des Fensters (Gate), das die Zellen repräsentiert, die in die Auswertung miteinbezogen werden sollen.	70
Abb. 4.1	Bindungsreihe der DNS-Aptamere gegen lösliches CD40-Ligand der Firma PeproTech.	76
Abb. 4.2	Bindung der DNS-Aptamerklone an verschiedene kommerziell erhältliche Formen von CD40-Ligand.	77
Abb. 4.3	Bindung des DNS-Aptamers S51A-C10 an verschiedene kommerziell erhältliche Formen von CD40-Ligand.	78
Abb. 4.4	Bindung der DNS-Bibliothek D40 an CD40-Ligand (PeproTech) in Selektionspuffer und RPMI-Medium, (mit 1 % HS und ohne HS) nach verschiedenen Inkubationszeiträumen	79
Abb. 4.5	Bindung der DNS-Aptamerklone S51A-C10 (a) und S51A-C15 (b) an CD40-Ligand (PeproTech) in Selektionspuffer und RPMI-Medium, (mit 1 % HS und ohne HS) nach verschiedenen Inkubationszeiträumen.	80
Abb. 4.6	Vorversuch zur Bindungskompetition der DNS-Aptamere an lösliches CD40L (PeproTech) durch rekombinantes CD40.	81
Abb. 4.7	Kompetition der Bindung der DNS-Aptamere an 125 nM lösliches CD40L (PeproTech) durch steigende Konzentrationen an rekombinatem CD40.	82
Abb. 4.8	Ermittlung der Affinität des Aptamers S51A-C10 an sCD40L mittels Filterbindungsanalyse.	85
Abb. 4.9	Ermittlung der Affinität des Aptamers S51A-C10 (Cy5 fluoreszenzmarkiert) an sCD40L in PBS, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> (a), 50 % Humanserum (b) und 50 % Vollblut (c) mittels optisch erzeugter Thermophorese.	86

Abb. 4.10	Bindung des CD40L-spezifischen DNS-Aptamers S51A-C10 an humanes und murines lösliches CD40-Ligand.	88
Abb. 4.11	Bindungsreihen der vom 3'- bzw. 5'-Ende stufenweise verkürzten S51A-C10-Sequenzen gegen lösliches CD40-Ligand der Firma PeproTech.	89
Abb. 4.12	Durchflusszytometrische Untersuchung des Einflusses von freiem Biotin auf die Bindung von über Streptavidin tetramerisierten Biotin-Aptamere an sCD40L-gekoppelte Dynabeads® M450-Epoxy.	92
Abb. 4.13	Durchflusszytometrische Bindungsanalyse verschiedener Variationen des CD40L-spezifischen DNS-Aptamers C10 auf mit sCD40L (PeproTech) gekoppelten Dynabeads® M450-Epoxy (Invitrogen™).	94
Abb. 4.14	Durchflusszytometrische Bindungsanalyse verschiedener Variationen des CD40L-spezifischen DNS-Aptamers C10 auf über 18 h mit PMA / Ionomycin stimulierten CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.	95
Abb. 4.15	Durchflusszytometrische Untersuchung des Einflusses von Humanserum auf die Bindung von über Streptavidin tetramerisierten Biotin-Aptameren an sCD40L-gekoppelte Dynabeads® M450-Epoxy.	97
Abb. 4.16	Durchflusszytometrische Untersuchung des Einflusses von MgCl <sub>2</sub> auf die Bindung von über Streptavidin tetramerisierten Biotin-Aptamere an sCD40L-gekoppelte Dynabeads® M450-Epoxy.	99
Abb. 4.17	Durchflusszytometrische Untersuchung des Einflusses von An- (a) und Abwesenheit (b) des Zielproteins auf die Stabilität der über Streptavidin tetramerisierten CD40L-spezifischen DNS-Aptamere.	101
Abb. 4.18	Durchflusszytometrische Bindungsanalyse des verkürzten CD40L-spezifischen DNS-Aptamers C10-28 an CD40L auf der Oberfläche unterschiedlich stimulierter humaner CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (23 h).	104
Abb. 4.19	Durchflusszytometrische Bindungsanalyse des verkürzten CD40L-spezifischen DNS-Aptamers C10-28 an CD40L auf der Oberfläche unterschiedlich stimulierter humaner CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (47 h).	105
Abb. 4.20	Durchflusszytometrische Bindungsanalyse verschiedener Variationen des CD40L-spezifischen DNS-Aptamers C10 auf Jurkat-Zellen (T-Zelllinie).	107
Abb. 4.21	Durchflusszytometrische Analyse der An- bzw. Abreicherung von CD40L <sup>+</sup> T-Zellen aus peripheren mononukleären Zellen mittels CD40L-spezifischer DNS-Aptamerklone.	109
Abb. 4.22	Mögliche Ansätze zur Ermittlung des inhibitorischen Potentials von CD40L-spezifischen DNS-Aptameren.	112
Abb. 4.23	Durchflusszytometrische Analyse der CD86-Expression humaner B-Zellen, die mithilfe unterschiedlicher Ansätze über die CD40-CD40L-Interaktion für 18 h stimuliert wurden.	114
Abb. 4.24	Durchflusszytometrische Analyse der B-Zell-Stimulation innerhalb PBMC mittels MegaCD40L™ sowie deren Inhibition mit steigenden Konzentrationen des anti-CD40L-Antikörpers (Klon 2B7).	116
Abb. 4.25	Durchflusszytometrische Analyse der B-Zell Stimulation mittels sCD40L und Verstärkermolekül (Enhancer) sowie deren partielle Inhibition mithilfe von tetramerisierten DNS-Aptameren.	118

Abb. 4.26	Durchflusszytometrische Bindungsanalyse der DNS-Modellaptamere Sgc8c (ALL T-Zelllinien-Binder) und TD05 (Ramos-Binder) auf verschiedenen Zelltypen.	120
Abb. 4.27	Durchflusszytometrische Bindungsanalyse des DNS-Modellaptamers Sgc8c (ALL T-Zelllinien-Binder) mit einem oder zwei HEG-Bausteinen als Abstandhalter auf Jurkat-Zellen.	121
Abb. 4.28	Fluoreszenzmikroskopische Visualisierung von verbrückten B-Zellen (Ramos; CD20-FITC) und T-Zellen (Jurkat; CD3-PE) durch multimerisierte bispezifische Aptamere (TD05 / Sgc8c).	122
Abb. 4.29	Durchflusszytometrische Analysen zur Beschreibung der zytolytischen Aktivität des bispezifischen multimerisierten Aptamers (TD05 / Sgc8c).	124
Abb. 4.30	RNS-Oligonukleotid mit 2'-Fluoro modifiziertem Pyrimidinnukleotid.	125
Abb. 4.31	Bindungsreihe der 2'-Fluoro-RNS-Aptamere gegen lösliches CD40-Ligand der Firma PeproTech.	127
Abb. 4.32	Bindung der 2'-Fluoro-RNS-Aptamerklone an verschiedene kommerziell erhältliche Formen von CD40-Ligand.	128
Abb. 4.33	Bindung der RNS-Bibliothek N47Ny an CD40-Ligand (PeproTech) in Selektionspuffer und RPMI-Medium, (mit 1 % HS und ohne HS) nach verschiedenen Inkubationszeiträumen.	129
Abb. 4.34	Bindung der RNS-Aptamerklone S132E-C11 (a), S132E-C26 (b) und S132E-C28 (c) an CD40-Ligand (PeproTech) in Selektionspuffer und RPMI-Medium, (mit 1 % HS und ohne HS) nach verschiedenen Inkubationszeiträumen.	130
Abb. 4.35	Vorversuch zur Bindungskompetition der 2'-Fluoro-RNS-Aptamere an lösliches CD40L (PeproTech) durch rekombinantes CD40.	131
Abb. 4.36	Kompetition der Bindung der 2'-Fluoro-RNS-Aptamere an 125 nM lösliches CD40L (PeproTech) durch steigende Konzentrationen an rekombinantem CD40.	132
Abb. 4.37	Ermittlung der Affinität der RNS-Aptamere S132E-C11, -C26 und -C28 an sCD40L mittels Filterbindungsanalyse.	134
Abb. 4.38	Bindung der CD40L-spezifischen 2'-Fluoro-RNS-Aptamere S132E-C20 und -C28 an humanes und murines lösliches CD40-Ligand.	135
Abb. 5.1	Vorschlag für die Faltung des Volllängen-Aptamers S51A-C10 (oben) und des verkürzten Aptamers C10-28 (unten) nach M. Zuker.	140
Abb. 5.2	Schematische Darstellung des Bis-Azid PEG-8 (= 45 Å) Linkermoleküls (a) und des 5-Arm PEG-Linkermoleküls (b).	149
Abb. 5.3	Alignment der Aminosäuresequenzen von murinem (blau) und humanem (rot) löslichen CD40L.	151

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Vergleich von Aptamer- und Antikörper-Technologie.	21
Tabelle 1.2	DNS- und RNS-Aptamere in jüngsten klinischen Studien.	22
Tabelle 4.1	Verschiedene kommerziell erhältliche rekombinante Formen des löslichen CD40L, die in dieser Arbeit verwendet wurden.	75
Tabelle 4.2	Kompetition der DNS-Aptamerbindung an 125 nM lösliches CD40L (PeproTech) durch steigende Konzentrationen an CD40 (ENZO Life Sciences).	83
Tabelle 4.3	Übersicht der verwendeten CD40L-spezifischen DNS-Aptamere mit Angabe der unterschiedlichen Modifikationen sowie des im Folgenden verwendeten Namens.	90
Tabelle 4.4	Viabilität, Ausbeute und Reinheit der Zellen nach Aptamer-basierter Magnet-assoziiierter Zellseparation mithilfe des über SA-PE tetramerisierten CD40L-spezifischen Aptamers 5'B-C10-28 und Anti-PE-MicroBeads.	110
Tabelle 4.5	Kompetition der RNS-Aptamerbindung an 125 nM lösliches CD40L (PeproTech) durch steigende Konzentrationen an CD40 (ENZO Life Sciences).	133
Tabelle 5.1	Prozentuale Ausbeute an Vollängen-Produkt in Abhängigkeit der Sequenzlänge im Rahmen der chemischen Synthese.	140

## 7.3 Abkürzungsverzeichnis

Für die Abkürzung von Einheiten wurde nach dem international gebräuchlichen SI-System verfahren. Für Aminosäuren und Nukleotide wurde der Einbuchstabencode verwendet. Gebräuchliche Wörter wurden gemäß Duden abgekürzt.

ACRP30	Adiponektin („Adipocyte Complement Related Protein of 30 kDa“)
AD	„ <u>A</u> nchoring“- <u>D</u> omäne des A-Kinase „Anchoring“-Proteins
ADCC	Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität („ <u>A</u> ntibody <u>D</u> ependent <u>C</u> ellular <u>C</u> ytotoxicity“)
ADME-Tox	<u>A</u> dsorption, <u>D</u> istribution, <u>M</u> etabolismus, <u>E</u> xkretion und <u>T</u> oxizität in der Pharmakokinetik
AK	<u>A</u> ntikörper
ALL	<u>a</u> kute lymphatische <u>L</u> eukämie
AMD	<u>a</u> ltersbedingte <u>M</u> akula <u>d</u> egeneration



AML	<u>a</u> kute <u>m</u> yeloische <u>L</u> eukämie
APC	Antigenpräsentierende Zelle („ <u>A</u> ntigen- <u>p</u> resenting <u>c</u> ell“)
APC	<u>A</u> llophycocyanin
APS	<u>A</u> mmoniumpersulfat
B-CLL	<u>c</u> hronisch-lymphatische <u>L</u> eukämie vom <u>B</u> -Zell-Typ
BiTE	<u>B</u> ispezifische <u>T</u> -Zell „ <u>E</u> ngager“
Bp	Basenpaar („ <u>b</u> ase <u>p</u> air“)
Bq	<u>B</u> ecquerel
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erumalbumin
bsAK	<u>b</u> ispezifischer <u>A</u> ntikörper
C5	Komplementkomponente C5;
CAD	Koronare Arterienkrankheit („ <u>C</u> oronary <u>A</u> rtery <u>D</u> isease“)
CCD	„ <u>c</u> harge <u>c</u> oupled <u>d</u> evice“ (ladungsgekoppelte Einheit); lichtaufnehmendes Bauelement in digitalen Kameras)
CCL2	Chemokin ( <u>CC</u> -Motiv) <u>L</u> igand <u>2</u>
CD	„ <u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation“ (Nomenklatur für Oberflächenantigene)
CFSE	5-(6) <u>C</u> arboxyfluorescein Diazetat, <u>S</u> uccinimidyl <u>E</u> ster
Ci	<u>C</u> urie
CLL	<u>c</u> hronisch-lymphatische <u>L</u> eukämie
Cpm	„ <u>c</u> ounts <u>p</u> er <u>m</u> inute“, Einheit der Radioaktivität in Zerfallsreaktionen pro Minute
CXCL12	<u>CXC</u> -Motiv-Chemokin <u>12</u>
Cy5	<u>C</u> yanin <u>5</u>
dAK	<u>D</u> omänen <u>a</u> ntikörper
DC	Dendritische Zelle („ <u>D</u> endritic <u>C</u> ell“)
DDD	<u>D</u> imerisierungs- und <u>D</u> ocking- <u>D</u> omäne der humanen Protein Kinase A
DLI	<u>D</u> onor- <u>L</u> ymphozyten- <u>I</u> nfusion
DNL	„ <u>D</u> ock- <u>a</u> nd- <u>L</u> ock“-Methode zur Herstellung trivalenter bispezifischer Antikörper-Konstrukte
DTT	<u>D</u> ithiothreitol
ELISA	<u>E</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>I</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>A</u> ssay
EMA	Europäische Arzneimittelagentur („ <u>E</u> uropean <u>M</u> edicines <u>A</u> gency“)
FACS	„ <u>F</u> luorescence <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orter“ (Durchflusszytometer)

FBA	<u>F</u> ilter <u>b</u> indungs <u>a</u> nalyse
FDA	behördliche Lebensmittelüberwachung und Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten („ <u>F</u> ood and <u>D</u> rug <u>A</u> dm <u>i</u> nistrat <u>i</u> on“)
FITC	<u>F</u> luorescin- <u>I</u> sothi <u>c</u> yanat
FSC	<u>F</u> orward <u>S</u> catter
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor („ <u>G</u> ranulocyte- <u>C</u> olony <u>S</u> t <u>i</u> mulating <u>F</u> actor“)
GvHD	„ <u>G</u> raft- <u>v</u> ersus- <u>H</u> ost <u>D</u> isease“ (Transplantat-Wirt-Reaktion)
GvL	„ <u>G</u> raft- <u>v</u> ersus- <u>L</u> eukemia“ (Transplantat gegen Leukämie)
Gy	<u>G</u> ray, Einheit der durch Radioaktivität und andere ionisierende Strahlung verursachte Energiedosis und beschreibt die pro Masse absorbierte Energie
HEG	<u>H</u> exa <u>e</u> thylenglykol
HLA	<u>h</u> umanes <u>L</u> eukozyten <u>a</u> ntigen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie („ <u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography“)
HS	<u>H</u> uman <u>s</u> erum
HSZT	<u>h</u> ämatopoetische <u>S</u> tamm <u>z</u> ell <u>t</u> ransplantation
I.E.	<u>I</u> nternationale <u>E</u> inheit, eine Einheit verhindert die Gerinnung von 1 ml citrathaltigem Plasma nach Zugabe von CaCl <sub>2</sub> bei 37 °C über eine Stunde
Ig	<u>I</u> mmunglobulin
IL	<u>I</u> nterleukin
IR	<u>I</u> nfrarot
MACS	Magnet-assoziierte Zellseparation („ <u>M</u> agnetic <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orting“)
MFI	<u>m</u> ediane <u>F</u> luoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („ <u>M</u> ajor <u>H</u> istocompatibility <u>C</u> omplex“)
min	<u>M</u> inute
NHL	<u>N</u> on- <u>H</u> odgkin- <u>L</u> ymphom
NK-Zellen	<u>N</u> atürliche <u>K</u> illerzellen
OD <sub>260</sub>	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte, hier bei einer Wellenlänge von 260 nm
PAA	<u>P</u> olyacrylamid
PAGE	<u>P</u> olyacrylamid- <u>G</u> elelektrophorese
PBMC	Periphere mononukleäre Blut-Zelle („ <u>P</u> eripheral <u>B</u> lood <u>M</u> ononuclear <u>C</u> ell“)
PC7	<u>P</u> hycoerythrin- <u>C</u> yanin <u>7</u>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („ <u>P</u> olymerase- <u>C</u> hain- <u>R</u> eaction“)

PDGF-B	Blutplättchen-Wachstumsfaktor („ <u>P</u> latelet- <u>d</u> erived growth factor <u>B</u> “)
PE	<u>P</u> hyco <u>e</u> rythrin
PEG	<u>P</u> oly <u>e</u> thylenglykol
PKA	<u>P</u> rotein- <u>K</u> inase <u>A</u>
PKC	<u>P</u> rotein- <u>K</u> inase <u>C</u>
PMA	<u>P</u> horbol-12- <u>m</u> yristat-13- <u>A</u> zetat
RPMI	Zellkulturmedium, am <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute entwickelt
rpm	Umdrehungen pro Minute („ <u>r</u> otations per <u>m</u> inute“)
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion („ <u>R</u> everse <u>t</u> ranscription polymerase <u>c</u> hain reaction“)
SA	<u>S</u> trept <u>a</u> vidin
Sc	Einzelkette („ <u>s</u> ingle <u>c</u> hain“)
SELEX	<u>S</u> ystematische <u>E</u> volution von <u>L</u> iganden durch <u>e</u> xponentielle Anreicherung
siRNS	kleine interferierende RNS („ <u>s</u> mall <u>i</u> nterference“)
SSC	Seitwärtsstreulicht („ <u>S</u> ide <u>S</u> catter“)
TEMED	<u>T</u> etramethylethylendiamin
T4-PNK	T4- <u>P</u> olynukleotidkinase
TK	<u>T</u> ransk <u>r</u> ipation
TMA	<u>t</u> hrombotische <u>M</u> ikro <u>a</u> ngiopathie
TNF	<u>T</u> umor <u>N</u> ekrose <u>F</u> aktor
TRIS	<u>T</u> ris(hydroxymethyl)-aminomethan
TZR	<u>T</u> - <u>Z</u> ell- <u>R</u> ezeptor
U	„ <u>U</u> nit“, Einheit der Enzymaktivität, 1 U ist definiert als diejenige Enzymmenge, die unter Standardbedingungen je min ein µmol Substrat umsetzt
V	<u>V</u> olt
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor („ <u>V</u> ascular <u>E</u> ndothelial <u>G</u> rowth Factor“)
vWF	<u>v</u> on- <u>W</u> illebrand- <u>F</u> aktor

## Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist. Die Arbeit wird erstmalig einer Prüfungskommission vorgelegt. Diese Dissertation wurde von Herr Prof. Dr. Kolb am Institut für Molekulare Immunologie des Helmholtz Zentrum München betreut und wird von Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß vor der biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München vertreten.

München, den 19.04.2012

---

Marion Zerwes

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt und somit zum Gelingen beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Raymund Buhmann, meinem Betreuer am Institut. Vielen Dank für die Möglichkeit, meine Arbeit in diesem faszinierenden und vielseitigen Thema anzufertigen, die intensive Betreuung, die immerwährende Diskussionsbereitschaft, die vielen Ideen und das wirklich hohe Engagement.

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß für das Vertreten meiner Arbeit an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, die wertvollen Hinweise und hilfreichen Anregungen.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Josef Mautner für die Begutachtung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Hans-Jochem Kolb sowie Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann danke ich, dass ich meine Doktorarbeit in der KKG-HZT anfertigen durfte.

Bei allen Mitarbeitern der KKG-HZT bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme in die Gruppe und die angenehme Zusammenarbeit.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Dr. Michael Blank für die außerordentliche Geduld und Hilfsbereitschaft bei allen „Aptamer-Angelegenheiten“ sowie die Bereitschaft sein enormes Wissen mit mir zu teilen.

Ganz besonders danke ich Kerstin für die wunderbare Zusammenarbeit, die ungewöhnliche Hilfsbereitschaft und für einfach alles...

Mein besonderer Dank gilt Brigitte für ihre Unterstützung in den verschiedensten Angelegenheiten, dafür dass sie immer ein offenes Ohr hat und für die vielen aufmunternden Gespräche in der Arbeit aber auch in der Freizeit.

Bei Susi bedanke ich mich für die nette Atmosphäre und dass ich sie in den letzten Monaten mit jeder Frage belästigen durfte.

Auch bei der gesamten Adler-Gruppe möchte ich mich herzlich für die gute Zusammenarbeit und die durchweg gute Laune bedanken.

Vielen Dank auch an die Stammzell-Mädels und die Schwestern der KMT-Amulanz, die sehr zur guten Stimmung beigetragen haben.

Frau Prof. Helga Schmetzer möchte ich dafür danken, dass ich immer zu ihr kommen kann, egal worum es geht, und natürlich für die unvergesslich lustigen Mittagessen – dein Lachen ist einfach ansteckend.

Bei Sylvia Donhauser und Allen Nasaka möchte ich mich für ihre Hilfe bei sämtlichen administrativen Fragen bedanken.

Ein herzlicher Dank geht natürlich auch an alle noch nicht erwähnten Kollegen im Hämatologikum und im Besonderen im IMI, die die letzten Jahre in diesem Institut zu etwas Besonderem gemacht haben.

Bei Herrn Dr. Philipp Baaske und seiner Gruppe von NanoTemper Technologies möchte ich mich ganz herzlich für die Unterstützung in Sachen Thermophorese sowie die viele Zeit bedanken.

Auch außerhalb des Labors gibt es natürlich eine Reihe von Personen, die mich während den letzten Jahren unterstützt haben.

Ich bin all meinen Freunden unendlich dankbar, dass sie immer da waren.

Allen voran danke ich meiner Freundin Franziska, die schon seit dem Kindergarten mit mir durch dick und dünn geht. Schön dass es dich gibt!

Meiner Freundin Julia möchte ich ganz herzlich für die schönen Treffen und die aufmunternden Telefonate danken.

Mein großer Dank gilt auch Anna für ihre Hilfe und Unterstützung vor allem während der Endphase meiner Arbeit.

Ganz besonders danke ich auch meinen Freunden Agi und Philipp für die schönen Kinoabende, das immer viel zu reichliche und viel zu gute Essen und die viele Zeit.

Meinem Freund Michl möchte ganz besonders für seine liebevollen Unterstützung in den letzten Jahren danken und dafür, dass er diese Arbeit so genau Korrektur gelesen hat. Mit seinem beständigen Zuspruch „ich glaub an dich“, „du schaffst das schon“, „ich bin so stolz auf dich“ hat er mich durch alle Höhen und Tiefen der letzten Jahre getragen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner ganzen Familie bedanken.

Meiner Oma danke für ihre liebe Fürsorge während der letzten Jahre.

Meinen Geschwistern Bassi, Carolin, Lisa, Hanno und Eva danke ich herzlich, dass sie mir, jeder auf seine eigene Weise, so viel Liebe und Kraft geben. Danke euch allen!

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mich zu dem gemacht haben, was ich heute bin. Ich danke meiner Mama, dass sie mir das Studium ermöglicht hat und mich immer liebevoll bei all meinen Plänen unterstützt. Du bist mein Halt, du bist mein Engel!